**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

FELICIA PETERSON CAVALHER

**Caracterização funcional das isoformas
de splicing do gene ADAM23**

São Paulo

**Data do Depósito na SPG:
06/07/2012**

FELICIA PETERSON CAVALHER

**Caracterização funcional das isoformas
de splicing do gene ADAM23**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica)*

Orientadora: Dra. Anamaria Aranha Camargo

Co-orientador: Dr. Érico Tosoni Costa

Versão original da Tese defendida

**São Paulo
2012**

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Cavalher, Felicia Peterson

C376c Caracterização funcional das isoformas de splicing do
gene ADAM23 / Felicia Peterson Cavalher. -- São Paulo,
2012.
196p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Camargo, Anamaria Aranha

Co-orientador: Costa, Érico Tosoni

1. Expressão gênica 2. Cancer 3. Biologia molecular 4.
Biologia celular I. T. II Camargo, Anamaria Aranha, orientador.
III. Costa, Érico Tosoni, co-orientador.

574.88 CDD

*Ao Fabrício,
meu querido,
pelo amor, pela compreensão e
pelo apoio incondicional em todos os momentos*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Anamaria Aranha Camargo, pelos valiosos ensinamentos, pelo constante incentivo, pelas oportunidades e pela atenção ao longo dos últimos oito anos, desde minha iniciação científica, até a conclusão de meu doutorado.

Ao meu co-orientador, Dr. Érico Tosoni Costa, pela paciência, pela dedicação, pelo estímulo, pelo grande aprendizado, pelas frequentes discussões científicas e pelo auxílio nos experimentos, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também pelas conversas sobre assuntos diversos (até mesmo sobre pesca!), que tornaram o cotidiano mais divertido.

À Tamara da Rocha Machado Ferreira, que me acompanhou em todos os momentos do doutorado, não só no laboratório, como também nas demais atividades da pós-graduação. Muito obrigada pela ajuda nos experimentos, pelas palavras de consolo nas incontáveis vezes em que eles não deram certo, pelo estímulo, pelas conversas diárias científicas ou não e, principalmente, pela amizade sincera.

A todos os amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica, tanto aos membros atuais, quanto àqueles que já se foram: Aline, Ana Paula, Anna Christina, Bruna, Camila, Daniel, Daniela, Eliane, Fabiana, Fabrício, Gabriela, Líliam, Maria Cristina, Natália, Paola, Paula, Raphael, Renata, Ricardo e Valéria. Agradeço pelo convívio diário, pelo apoio e por tudo o que me ensinaram.

Aos demais colegas do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, pela convivência, pelo suporte técnico e administrativo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (ILPC), pelo apoio financeiro, essencial para a realização deste trabalho.

Às minhas grandes amigas da Biologia, pelas experiências, pelas descobertas e pelos conhecimentos compartilhados, não só acerca de assuntos científicos, mas, principalmente, dos demais aspectos da vida. A amizade de vocês tem valor inestimável para mim!

Aos meus queridos irmãos, Fernando Neto, Fernanda, Flávia, Francine e Fernando, pela amizade, pelos momentos de lazer, pela compreensão, pela paciência e, sobretudo, pelo carinho, sempre. Muito obrigada por torcerem constantemente por mim, por me ajudarem nos momentos difíceis e pelas alegrias que vivenciamos juntos!

À Sra. Maria de Lourdes e ao Sr. Antônio, meus segundos pais, por estarem sempre prontos para me abraçar, me ouvir, me aconselhar e compartilhar comigo minhas alegrias e inseguranças. Os momentos que passamos juntos foram essenciais para que eu conseguisse concluir esta etapa. Enfim, muito obrigada por me tratarem como sua filha!

Aos meus pais, Debora e Fernando, pelo incentivo intelectual, pelo suporte emocional, e mesmo estando longe, por acompanharem de perto minhas descobertas, minhas dificuldades e minhas conquistas. Sou imensamente grata por tudo o que me deram: as oportunidades, as condições necessárias, o exímio exemplo e, principalmente, todo o seu amor, elementos que, juntos, me possibilitaram esta vitória!

Ao Fabrício, meu companheiro tão amado... Não tenho palavras para lhe agradecer por tudo o que fez e faz por mim! Obrigada pela compreensão nas inúmeras vezes em que me ausentei para me dedicar ao trabalho científico, pelo carinho e pela paciência quando os experimentos não funcionaram corretamente, pelo interesse na minha pesquisa (mesmo sem compreender nada do meu projeto!), por se alegrar com minhas conquistas, e, principalmente, por estar ao meu lado e me apoiar em todas as minhas decisões. Muito obrigada pelo seu imenso amor!

*A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.*

Albert Einstein

RESUMO

Cavalher, F.P. **Caracterização funcional das isoformas de *splicing* do gene ADAM23**. 2012. 196p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A ADAM23 é uma glicoproteína transmembrana pertencente à família ADAM (*Disintegrin and Metalloprotease*) que apresenta a estrutura protéica típica dos membros desta família, mas não possui atividade de metaloprotease. O gene ADAM23 apresenta três isoformas de *splicing*, α , β e γ , que codificam proteínas com porções C-terminais distintas. As isoformas α e β codificam proteínas com domínios transmembranas diferentes, enquanto γ provavelmente consiste em uma isoforma secretada ou citoplasmática de ADAM23. Foi demonstrado que o gene ADAM23 está epigeneticamente silenciado em tumores de mama de estágios mais avançados e que seu silenciamento está associado a um maior risco de desenvolvimento de metástases e a um pior prognóstico. Recentemente, foi descrito que a proteína ADAM23 interage diretamente com a integrina $\alpha V\beta 3$ na linhagem tumoral de mama MDA-MB-435, sendo capaz de modular seu estado conformacional, controlando sua ativação. Utilizando RNAi, observou-se que o silenciamento completo do gene ADAM23 (i.e., as três isoformas) aumenta os níveis de $\alpha V\beta 3$ em conformação ativa na superfície das células MDA-MB-435, promovendo um incremento de sua capacidade migratória e adesiva. No presente trabalho, avaliamos por reações de amplificação em tempo real o perfil de expressão das três isoformas de *splicing* do gene ADAM23 em cinco tecidos normais (mama, cólon, cérebro, próstata e pâncreas) e em doze linhagens tumorais derivadas destes tecidos. Observamos diferenças nos níveis de expressão das isoformas em todas as amostras avaliadas, tanto dentro de uma determinada amostra, como quando comparamos tecidos normais entre si ou com linhagens tumorais. A isoforma γ é a mais expressa em todos os tecidos normais (exceto em cérebro) e em todas as linhagens tumorais. Em tecido normal de mama e de próstata e nas doze linhagens tumorais, ADAM23 α é a segunda isoforma mais expressa, sendo β a menos expressa. Constatamos também que a fração representada por cada isoforma, em relação à expressão total do gene ADAM23, está alterada nas linhagens tumorais, em comparação aos tecidos normais correspondentes. Com o intuito de elucidar a função das isoformas de ADAM23 separadamente, utilizamos shRNAs (*short hairpin RNAs*) para reduzir a expressão de cada isoforma de modo individual e específico na linhagem tumoral MDA-MB-435, e avaliamos seu efeito na proliferação, na morfologia, na adesão e no espraio celular. Verificamos que a redução da expressão da isoforma γ aumentou significativamente a taxa de proliferação das células MDA-MB-435 cultivadas em modelo tridimensional. Demonstramos também que ADAM23 γ participa da regulação da morfologia e da capacidade de espraio das células MDA-MB-435 em condições padrão de cultivo (i.e., meio de cultura completo e placas não-sensibilizadas com substratos) e em componentes específicos da matriz extracelular, como fibronectina, colágeno I e matrigel. A isoforma α também está envolvida no controle da morfologia e do espraio da linhagem MDA-MB-435, porém, de modo distinto da isoforma γ . Já ADAM23 β não interfere na morfologia das células MDA-MB-435 e tem efeito marginal no espraio celular apenas em condições padrão de cultivo. Em conjunto, nossos resultados demonstram que as isoformas de ADAM23 são diferencialmente expressas em tecidos normais e tumorais, e exercem funções biológicas distintas.

Palavras-chave: ADAM23, *splicing*, expressão gênica, proliferação, espraio celular.

ABSTRACT

Cavalher, F.P. **Functional characterization of ADAM23 gene splicing isoforms.** 2012. 196p. PhD Thesis. Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ADAM23 is a transmembrane glycoprotein that belongs to the ADAM (*A Disintegrin and Metalloprotease*) family of proteins and exhibits the typical protein structure of the family members, but it doesn't have metalloprotease activity. The ADAM23 gene has three splicing isoforms, α , β and γ , that code for proteins with different C-terminal regions. Isoforms α and β code for proteins with different transmembrane domains, while γ probably constitute a secreted or cytoplasmatic isoform of ADAM23. It has been demonstrated that the ADAM23 gene is epigenetically silenced in advanced stage breast tumors and that its silencing is associated with a higher risk of developing metastases and with a worse prognosis. Recently, it was described that ADAM23 protein interacts directly with $\alpha V\beta 3$ integrin in the breast tumor cell line MDA-MB-435, modulating its conformational state and controlling its activation. Using RNAi, it was observed that the complete silencing of ADAM23 gene (the three isoforms) raises the levels of $\alpha V\beta 3$ in its active conformation in the surface of MDA-MB-435 cells, promoting an increase in its migratory and adhesive capacity. In the present work, we evaluated by real time PCR the expression pattern of the three splicing isoforms of ADAM23 gene in five normal tissues (breast, colon, brain, prostate and pancreas) and in twelve tumor cell lines derived from these tissues. We observed differences in the expression levels of the three isoforms in all samples, either within a specific sample or comparing normal tissues among them or with tumor cell lines. Isoform γ has the highest expression in all normal tissues (except for brain) and in all tumor cell lines evaluated. In breast and prostate normal tissues and in all tumor cell lines, ADAM23 α is the second most expressed isoform, while β is the less expressed. We also noticed that the ratio represented by each isoform, relative to the total expression of ADAM23 gene, is altered in the tumor cell lines, compared to the corresponding normal tissues. With the aim to elucidate the function of ADAM23 isoforms separately, we used shRNAs (short hairpin RNAs) to reduce the expression of each isoform specifically in the MDA-MB-435 tumor cell line, and studied its effects in proliferation, morphology, adhesion and cell spreading. We observed that the reduced expression of isoform γ significantly increased the proliferation rate of MDA-MB-435 cells cultivated in tridimensional system. Also, we demonstrated that ADAM23 γ participates in the regulation of cell morphology and spreading of MDA-MB-435 cells, both in standard culture conditions (cell culture media with fetal serum and in plates not sensitized with substrates) and in specific components of extracellular matrix, such as fibronectin, collagen type I and matrigel. Isoform α is also involved in the control of morphology and spreading of MDA-MB-435 cell line, although in a distinct manner from isoform γ . ADAM23 β doesn't interfere in the morphology of MDA-MB-435 cells and plays a discrete role in cell spreading only under standard culture conditions. Together, our results demonstrate that ADAM23 isoforms are differently expressed in normal and tumoral tissue, and play distinct biological roles.

Key words: ADAM23, splicing, gene expression, proliferation, cell spreading.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação esquemática de uma proteína da família ADAM e seus domínios característicos.	27
Figura 2	Organização exon/intron do gene ADAM23 humano, suas isoformas de splicing alternativo e estrutura das proteínas codificadas por cada isoforma.	33
Figura 3	Interferência de RNA (RNAi) para as isoformas α , β e γ do gene ADAM23.	66
Figura 4	Mapa do vetor plasmidial pAVU6+27.	68
Figura 5	Construções de shRNA para as isoformas α , β e γ do gene ADAM23.	70
Figura 6	RNA mensageiro primário do gene ADAM23 humano, destacando-se sua extremidade 3', o processo de splicing alternativo para as isoformas α , β e γ , e a localização dos iniciadores utilizados para amplificar cada isoforma.	83
Figura 7	Reações de amplificação em tempo real para as isoformas α , β e γ do gene ADAM23 e para os genes endógenos HMBS e PUM1.	85
Figura 8	Curva-padrão para quantificação do número de cópias dos transcritos das isoformas de splicing α , β e γ do gene ADAM23 e dos controles endógenos HMBS e PUM1.	89
Figura 9	Expressão absoluta das isoformas de splicing α , β e γ de ADAM23 em tecidos normais e em linhagens tumorais de mama, cólon, cérebro, próstata e pâncreas.	93
Figura 10	Expressão relativa das isoformas de splicing α , β e γ de ADAM23 em tecidos normais e em linhagens tumorais de mama, cólon, cérebro, próstata e pâncreas, em comparação à expressão total do gene ADAM23.	98
Figura 11	Avaliação do efeito da interferência de RNA de dois duplexes distintos na expressão das isoformas α , β e γ do gene ADAM23.	106
Figura 12	Avaliação do efeito dos shRNAs α , β e γ na expressão das isoformas do gene ADAM23 na linhagem tumoral MDA-MB-435.	110

Figura 13	Avaliação da expressão das isoformas do gene ADAM23 em clones isolados das populações Alfa, Beta, Gama e VV (vetor vazio).	113
Figura 14	Expressão absoluta das isoformas α , β e γ do gene ADAM23 em derivados clonais da linhagem MDA-MB-435 que expressam estavelmente shRNAs construídos para silenciar a expressão de cada isoforma separadamente.	117
Figura 15	Avaliação da proliferação em cultura bidimensional dos derivados clonais da linhagem MDA-MB-435 com diminuição da expressão das isoformas α , β ou γ do gene ADAM23, além dos clones que expressam o vetor pAVU6+27 vazio e do clone com completo silenciamento do gene ADAM23, em comparação às células-controle (WT).	120
Figura 16	Expressão absoluta das isoformas α , β e γ do gene ADAM23 nos derivados clonais da linhagem MDA-MB-435 que expressam estavelmente shRNAs α , β ou γ cultivados em condições tridimensionais, para formação de esferóides multicelulares.	123
Figura 17	Avaliação do efeito da redução da expressão das isoformas α , β ou γ do gene ADAM23 na taxa de incorporação de BrdU da linhagem MDA-MB-435 cultivada em esferóides (modelo tridimensional).	126
Figura 18	Avaliação do impacto da redução da expressão das isoformas α , β ou γ do gene ADAM23 na capacidade de sobrevivência livre de ancoragem da linhagem MDA-MB-435 em sistema tridimensional.	129
Figura 19	Imagens representativas da linhagem MDA-MB-435 parental e de seus derivados clonais com redução da expressão da isoforma α , β ou γ do gene ADAM23, além de clones que expressam o vetor vazio, mantidos em condições padrão de cultivo.	134
Figura 20	Avaliação da morfologia celular da linhagem MDA-MB-435 e de seus derivados com redução da expressão das isoformas α , β ou γ do gene ADAM23 em diferentes componentes da matriz extracelular.	136
Figura 21	Avaliação do impacto da redução da expressão das isoformas α , β ou γ do gene ADAM23 na capacidade de adesão das células MDA-MB-435 em condições padrão de cultivo.	140

Figura 22	Avaliação do impacto da redução da expressão das isoformas α , β ou γ do gene ADAM23 na capacidade de adesão da linhagem MDA-MB-435 em vitronectina e em fibronectina.	142
Figura 23	Avaliação do espraioamento celular da linhagem MDA-MB-435 e de seus derivados com redução da expressão das isoformas α , β ou γ do gene ADAM23 em diferentes componentes da matriz extracelular ou em presença de meio de cultura completo.	147

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência dos iniciadores específicos utilizados para amplificar as isoformas α , β e γ do gene ADAM23 individualmente, e os genes endógenos HMBS e PUM1, empregados como normalizadores das reações de amplificação em tempo real.	55
Tabela 2	Quantificação absoluta do número de cópias das isoformas α , β e γ do gene ADAM23 em tecidos normais e em doze linhagens tumorais derivadas de cinco tecidos distintos (mama, cólon, cérebro, próstata e pâncreas).	92
Tabela 3	Tempo de dobramento da linhagem MDA-MB-435 WT e de seus derivados clonais com redução da expressão das isoformas α , β ou γ do gene ADAM23, além dos clones VV1, VV2 e A23neg, calculado a partir da fase logarítmica das curvas de proliferação celular em cultura bidimensional.	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAM	do inglês <i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
ADAMT	do inglês <i>A Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin motifs</i>
APP	do inglês <i>Amyloid-β Precursor Protein</i> – proteína precursora amiloide β
BrdU	bromodeoxiuridina
BSA	do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i> – albumina sérica bovina
CD23	do inglês <i>Cluster of Differentiation 23</i>
CD44	do inglês <i>Cluster of Differentiation 44</i>
CX3CL1	do inglês <i>Chemokine (C-X₃-C motif) ligand 1</i> – ligante 1 da quimiocina de domínio CX ₃ C
CXCL16	do inglês <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 16</i> – ligante 16 da quimiocina de domínio CXC
C_T	do inglês <i>Cycle Threshold</i> – ciclo do limiar
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT	ditiotreitol
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> - meio de cultura celular
E-caderina	caderina epitelial
ECD	sequência de aminoácidos glutamato, cisteína e ácido aspártico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	do inglês <i>Epidermal Growth Factor</i> - fator de crescimento epidermal
EGFR	do inglês <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> – receptor do fator de crescimento epidermal
ERBB4/HER4	receptor de superfície celular do tipo tirosina quinase
FGFR2	do inglês <i>Fibroblast Growth Factor Receptor 2</i> – receptor 2 do fator de crescimento de fibroblastos
HB-EGF	do inglês <i>Heparin-binding EGF-like Growth Factor</i> – fator de crescimento epidermal ligante de heparina
HER2/neu	do inglês <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i> – receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano
HEPES	N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfonato]
ICAM-1	do inglês <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> – molécula de adesão intercelular 1
IL6R	do inglês <i>Interleukin 6 Receptor</i> – receptor da interleucina 6
IPTG	isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo

kDa	kilodalton
L-selectina	selectina de leucócitos
L1-CAM	do inglês <i>L1 Cell Adhesion Molecule</i> – molécula de adesão celular L1
MDC	do inglês <i>Metalloprotease-like Disintegrin-like Cystein-rich</i>
MMP	do inglês <i>Matrix Metalloprotease</i> – metaloprotease de matriz
MSP	do inglês <i>Methylation Specific PCR</i> – PCR específico para metilação
MS	inglês <i>Multicellular Spheroids</i> – esferóides multicelulares
N-caderina	caderina neural
NGF	do inglês <i>Nerve Growth Factor</i> – fator de crescimento de nervos
pb	pares de base
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PBST	solução salina tamponada com fosfato acrescida de Tween 20
PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> – reação em cadeia da polimerase
PDGF	do inglês <i>Platelet-Derived Growth Factor</i> – fator de crescimento derivado de plaquetas
PI3K	do inglês <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PrP^c	proteína príon celular
RGD	sequência de aminoácidos arginina, glicina e ácido aspártico
RISC	do inglês <i>RNA-induced silencing complex</i> – complexo de silenciamento induzido por RNA
RPMI	do inglês <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> - meio de cultura celular
RNAi	do inglês <i>RNA interference</i> – interferência de RNA
RTK	do inglês <i>Receptor Tyrosine Kinase</i> – receptor tirosina quinase
SDS	dodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
shRNA	do inglês <i>short hairpin RNA</i> – pequeno grampo de RNA
siRNA	do inglês <i>short interfering RNA</i> – RNA de interferência pequeno
SNC	Sistema Nervoso Central
SVMP	do inglês <i>Snake venom metalloprotease</i> – metaloprotease de veneno de cobra
TACE	do inglês <i>Tumor necrosis factor α convertase</i> – convertase do fator de necrose tumoral α
TGFα	do inglês <i>Transforming growth factor-α</i> - fator de crescimento de transformação α
TNFα	do inglês <i>Tumor necrosis factor-α</i> - fator de necrose tumoral α

TNFR I	do inglês <i>Tumor necrosis factor Receptor I</i> – receptor I do fator de necrose tumoral
TNFR II	do inglês <i>Tumor necrosis factor Receptor II</i> – receptor II do fator de necrose tumoral
TRAIL	do inglês <i>Tumor necrosis factor (TNF)-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i> – ligante indutor de apoptose relacionado a TNF
TRANCE	do inglês <i>Tumor necrosis factor (TNF)-Related Activation-induced Cytokine</i> – citocina induzida por ativação relacionada a TNF
VE-caderina	caderina do endotélio vascular
VEGF	do inglês <i>Vascular endothelial growth factor</i> – fator de crescimento do endotélio vascular
WT	do inglês <i>Wild Type</i> – células parentais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	A família ADAM e sua estrutura protéica	20
1.2	O gene ADAM23: estrutura gênica e isoformas de splicing	30
1.3	ADAM23 e seu envolvimento com o câncer	36
1.4	ADAM23 e a modulação da atividade de integrinas $\alpha V\beta 3$	39
1.5	Outros parceiros moleculares de ADAM23	45
1.6	ADAM23 e o controle da proliferação e da invasão de células tumorais	46
2	OBJETIVOS	50
3	MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1	Linhagens celulares tumorais e amostras de RNA de tecidos normais	51
3.2	Reagentes e soluções empregados na cultura de células	51
3.3	Extração de RNA das linhagens celulares	52
3.4	Síntese de cDNA	53
3.5	Reações de amplificação em tempo real	54
3.6	Avaliação da expressão gênica pelo método de quantificação relativa	57
3.7	Avaliação da expressão gênica pelo método de quantificação absoluta	59
3.8	Desenho dos duplexes para interferência de RNA (RNAi)	62
3.9	Transfecção da linhagem tumoral MDA-MB-435 com os duplexes sintéticos para interferência de RNA	67
3.10	Construções de shRNA para interferência de RNA	67
3.11	Clonagem das construções de shRNA	71
3.12	Transfecção da linhagem tumoral MDA-MB-435 com os plasmídeos recombinantes contendo shRNAs isoforma-específicos	73
3.13	Isolamento de clones das populações derivadas da linhagem MDA-MB-435 expressando estavelmente shRNA α , β ou γ	74
3.14	Curva de proliferação em cultura bidimensional	74
3.15	Produção de esferóides multicelulares <i>in vitro</i>	75
3.16	Ensaio de incorporação de BrdU em células cultivadas em 3-D	75
3.17	Ensaio de formação de colônias independente de ancoragem	77
3.18	Ensaio de adesão em condições padrão de cultivo <i>in vitro</i>	77

3.19	Ensaio de adesão em vitronectina e fibronectina <i>in vitro</i>	78
3.20	Ensaio de espraiamento celular (<i>spreading</i>) <i>in vitro</i>	79
3.21	Ensaio de morfologia celular	80
3.22	Análise estatística	81
4	RESULTADOS	82
4.1	Padronização de um ensaio para avaliar a expressão diferencial das isoformas de splicing do gene ADAM23	82
4.2	Avaliação da expressão diferencial das isoformas de splicing do gene ADAM23 em tecidos normais e linhagens tumorais	87
4.3	Avaliação do efeito de diferentes duplexes de interferência de RNA no silenciamento específico das isoformas de splicing α , β e γ do gene ADAM23	103
4.4	Silenciamento estável da expressão das isoformas de splicing α , β e γ do gene ADAM23 na linhagem tumoral de mama MDA-MB-435.	108
4.5	Impacto da redução da expressão das isoformas do gene ADAM23 na proliferação e na sobrevivência da linhagem MDA-MB-435	120
4.6	Alterações morfológicas na linhagem tumoral MDA-MB-435 decorrentes da diminuição da expressão das isoformas α ou γ do gene ADAM23	131
4.7	Avaliação do impacto da redução da expressão das isoformas de ADAM23 na adesão da linhagem MDA-MB-435	139
4.8	Regulação da capacidade de espraiamento celular (<i>spreading</i>) mediada pelas isoformas de ADAM23	146
5	DISCUSSÃO	152
5.1	Avaliação do padrão de expressão das isoformas de splicing α , β e γ de ADAM23 em tecidos normais e linhagens tumorais	152
5.2	Produção de derivados celulares da linhagem tumoral MDA-MB-435 com diminuição da expressão das isoforma α , β ou γ do gene ADAM23 individualmente	160
5.3	A redução da expressão da isoforma γ do gene ADAM23 aumenta a taxa de proliferação das células MDA-MB-435 cultivadas em modelo tridimensional <i>in vitro</i>	166
5.4	ADAM23 γ : uma proteína fundamental para o controle da morfologia e da capacidade de espraiamento da linhagem tumoral MDA-MB-435	169

5.5	A isoforma α de ADAM23 também regula a morfologia e a capacidade de espraiamento das células MDA-MB-435	175
5.6	ADAM23 β exerce funções biológicas distintas das isoformas α e γ , e que permanecem obscuras	176
5.7	Últimas considerações e conclusões finais	178
6	CONCLUSÕES	181
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	184

1 INTRODUÇÃO

1.1 A família ADAM e sua estrutura protéica

As ADAMs (**A** *Disintegrin* **A**nd **M**etalloprotease), também chamadas de MDC (**M**etalloprotease-like, **D**isintegrin-like, **C**ystein-rich), são glicoproteínas transmembranares do tipo 1 caracterizadas pela presença de múltiplos domínios funcionais em sua estrutura, o que lhes confere grande complexidade estrutural. As ADAMs exercem papel fundamental na regulação do fenótipo celular, modulando interações célula-célula, a adesão à matriz extracelular, o processamento proteolítico de diversas moléculas de superfície e a sinalização intra e intercelular (WOLFSBERG et al. 1995a e b; BLACK e WHITE 1998; PRIMAKOFF e MYLES 2000).

Até o momento, foram identificados 40 membros desta família, encontrados em inúmeras espécies de animais, desde os invertebrados, como *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*, até diferentes grupos de vertebrados, como *Danio rerio* (zebrafish), *Xenopus laevis* e várias espécies de mamíferos, o que demonstra sua grande importância biológica. Ao todo, 21 membros da família foram descritos em humanos: ADAM 2, 6-12, 15, 17-23, 28-30, 32 e 33¹. Entretanto, ainda não foram identificadas ADAMs em plantas e em seres eucariontes unicelulares.

¹ Table of the ADAMs. Disponível em:

<http://www.people.virginia.edu/~jw7g/Table_of_the_ADAMs.html>. Acesso em 15/04/2012.

Dentre os diferentes domínios protéicos presentes nos membros da família ADAM, destacam-se os domínios de metaloprotease e de desintegrina, responsáveis pela denominação dada a este grupo de proteínas. Sua singularidade reside no fato de esta ser a única família de proteínas de superfície potencialmente capazes de atuar na proteólise e na adesão celular de modo simultâneo. Além destes domínios, também estão presentes nos diversos membros desta família o pró-domínio, o domínio rico em cisteínas, o domínio com similaridade ao fator de crescimento epidermal (*EGF-like*), o domínio transmembrana e o domínio citoplasmático (Figura 1) (SCHLONDORFF e BLOBEL 1999; PRIMAKOFF e MYLES 2000).

As ADAMs são muito semelhantes estruturalmente a outros dois grupos de proteínas secretadas: as ADAMTs (*A Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin motifs*) (TANG e HONG 1999) e as metaloproteases de veneno de cobra da classe III (SVMPs, *Snake venom metalloprotease*) (FOX e BJARNASON 1995). Dentre os domínios em comum, estão: o pró-domínio e os domínios de metaloprotease, de desintegrina e rico em cisteínas (JIA et al. 1996). Devido à similaridade estrutural entre estas três famílias de proteínas, elas foram reunidas no subgrupo das Adamalisinases, uma divisão das Metzincinas. As Metzincinas pertencem à superfamília de metaloproteases dependentes de zinco e receberam esta denominação devido à existência de um resíduo de metionina extremamente conservado em uma volta da proteína situada próxima ao seu sítio catalítico (*Met-turn*). Outra divisão das Metzincinas é o subgrupo das Matrixinas, ao qual pertencem as MMPs (*Matrix Metalloproteases*), evidenciando a semelhança entre estas proteínas e as ADAMs (SEALS e COURTNEIDGE 2003).

Na região N-terminal, ADAMs, ADAMTs, SVMPs e MMPs possuem uma sequência sinal que direciona a proteína para a via secretora. As proteínas

precursoras são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e encaminhadas para a maturação no sistema de Golgi. A latência da atividade metaloprotease nas proteínas imaturas é mantida pelo pró-domínio, encontrado logo após a região N-terminal. Durante seu trajeto pelo Golgi, ocorre a clivagem do pró-domínio por pró-proteínas convertases do tipo furinas ou por atividade autocatalítica, originando as proteínas maduras. O pró-domínio também exerce papel de chaperona intracelular, auxiliando no correto dobramento da proteína, especialmente do domínio de metaloprotease (SEALS e COURTNEIDGE 2003).

Seguindo-se ao pró-domínio, encontra-se o domínio de metaloprotease, que atua na clivagem do ectodomínio de diversas proteínas de membrana (*shedding*) e de componentes da matriz extracelular. Em Metzincinas, o sítio catalítico do domínio de metaloprotease apresenta uma sequência consenso de aminoácidos HEXGHXXGXXHD, a qual é bastante conservada. Os três resíduos de histidina (H) deste sítio constituem os três ligantes de zinco e o resíduo de ácido glutâmico (E) atua como base catalítica (RAWLINGS e BARRETT 1995). Conforme mencionado anteriormente, *downstream* a esta sequência encontra-se o resíduo de metionina característico deste grupo enzimático, que se projeta em uma volta da proteína e se insere no cerne do sítio catalítico (*Met-turn*) (BODE et al. 1993). Devido à presença destes resíduos conservados no sítio ativo, 12 das 21 ADAMs humanas são consideradas cataliticamente ativas (ADAMs 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30 e 33). Os demais membros da família ADAM presentes em humanos possuem um ou mais aminoácidos não-conservados na região do sítio catalítico, sugerindo que, nestas ADAMs, o domínio metaloprotease esteja inativo e seja importante para manter a correta estrutura terciária da proteína e/ou para as interações

intermoleculares (Figura 1, em detalhe) (SEALS e COURTNEIDGE 2003; EDWARDS et al. 2008).

As ADAMs cataliticamente ativas atuam no processamento de diversas moléculas de superfície, incluindo citocinas (ex: $\text{TNF}\alpha$, CD23, TRAIL, TRANCE), quimiocinas (ex: CX3CL1, CXCL16), fatores de crescimento (ex: $\text{TGF}\alpha$, EGF, HB-EGF, NGF, anfirregulina e epirregulina), moléculas de adesão (ex: E-caderina, N-caderina, VE-caderina, L-selectina, CD44, L1-CAM, ICAM-1) e seus respectivos receptores (ex: TNFR1, TNFR2, IL6R, FGFR2, HER2/neu, ErbB4/HER4), além de outras proteínas, como o receptor Notch, a proteína precursora amilóide (APP), a proteína príon celular (PrP^c), a proteína FAS ligante, entre outras. As ADAMs também são capazes de clivar componentes da matriz extracelular, como colágeno do tipo IV, gelatina e fibronectina, participando ativamente do seu remodelamento (EDWARDS et al. 2008; MURPHY 2008).

O domínio desintegrina das ADAMs recebeu esta denominação devido à alta similaridade de sua sequência com o domínio homônimo das SVMPs. Em SVMPs, este domínio interage com as integrinas de plaquetas impedindo sua ligação com a fibrina e bloqueando sua agregação, o que inibe a formação do coágulo sanguíneo e favorece hemorragias (NIEWIAROWSKI et al. 1994). O domínio desintegrina das SVMPs mimetiza o domínio de ligação de proteínas de matriz aos sítios de interação das integrinas, como a fibronectina, um ligante clássico de integrinas. Assim como a fibronectina, algumas SVMPs possuem uma sequência consenso de aminoácidos RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) em uma região de seu domínio desintegrina que se projeta da superfície da proteína, formando um *loop* composto por aproximadamente 13 aminoácidos, o qual promove a ligação com integrinas. Entretanto, exceto pela ADAM15, os outros membros ADAMs e muitas SVMPs de

classe III não possuem a sequência de aminoácidos RGD em seu domínio desintegrina, o que não impede que se associem com integrinas e sindecans (BLOBEL et al. 1992; JIA et al. 1996; KRÄTZSCHMAR et al. 1996). Todas as ADAMs, com exceção das ADAMs 10 e 17, apresentam um motivo consenso de aminoácidos no *loop* de seu domínio desintegrina, CRXXXXXCDXXEXC (para a ADAM15, CRPTRGDCDLPEFC), evidenciando a importância desta região para a interação com moléculas de adesão (Figura 1, em detalhe) (ETO et al. 2002).

A associação entre ADAMs e integrinas é bastante variável e, em alguns casos, promíscua. Algumas integrinas podem interagir com diversas ADAMs, como $\alpha 9\beta 1$, que é capaz de se ligar às ADAMs 1, 2, 3, 7, 9, 12, 15, 28 e 33. Outras, entretanto, associam-se apenas a alguns membros desta família, como por exemplo, $\alpha V\beta 3$, que interage com as ADAMs 15 e 23. De modo análogo, algumas ADAMs estabelecem interações com várias integrinas, enquanto outras são altamente específicas. ADAM9, por exemplo, é capaz de se ligar a $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 9\beta 1$ e $\alpha V\beta 5$; já ADAM17 (TACE) parece interagir exclusivamente com $\alpha 5\beta 1$ (ARRIBAS et al. 2006; MOCHIZUKI e OKADA 2007; EDWARDS et al. 2008). É preciso considerar, porém, que muitos dos estudos que avaliaram essas interações foram conduzidos utilizando domínios desintegrinas recombinantes, que não mimetizam a estrutura tridimensional e o contexto da proteína nativa.

Muitos trabalhos da literatura têm demonstrado que interações entre ADAMs e integrinas são fundamentais na modulação dos processos de adesão e migração celular, independentemente da atividade proteolítica das ADAMs. BAX et al. (2004) demonstraram que a porção extracelular completa da ADAM17 ou TACE (*Tumor necrosis factor α convertase*) e a integrina $\alpha 5\beta 1$ se associam tanto em *cis* quanto em *trans*, e que esta interação promove um aumento da capacidade de adesão e

espalhamento celular. A expressão exógena de ADAM12 em células CHO que expressam as integrinas $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ ou ambas, revelou que esta ADAM inibe especificamente a migração celular mediada pela integrina $\alpha 4\beta 1$, mas não por $\alpha 5\beta 1$, obedecendo o padrão de interação entre seu domínio desintegrina e estas moléculas. Neste mesmo trabalho, foi demonstrado ainda que o domínio desintegrina é fundamental para o efeito da ADAM12 na migração celular, o qual se mostrou independente da atividade do domínio metaloprotease (HUANG et al. 2005).

O domínio rico em cisteína também possui propriedade adesiva. Em algumas ADAMs, ele é capaz de se ligar diretamente a moléculas de adesão, como na ADAM12, em que se liga a sindecans e promove subsequentemente o recrutamento de integrinas do tipo $\beta 1$ (IBA et al. 1999, 2000). Em outros membros desta família, contudo, esta região parece complementar a capacidade de ligação do domínio desintegrina e, provavelmente, confere especificidade à interação. GAULTIER et al. (2002) demonstraram que os domínios rico em cisteína e desintegrina de ADAM13 se ligam a fibronectina e a receptores de integrinas do tipo $\beta 1$, e que esta ligação pode ser inibida por anticorpos capazes de bloquear o domínio rico em cisteína.

Em relação ao domínio com similaridade ao fator de crescimento epidermal (*EGF-like*), seu papel não foi elucidado até o momento e não há na literatura estudos funcionais envolvendo este domínio.

O domínio transmembrana é importante para ancorar a proteína à membrana celular. Juntamente com o citoplasmático, este domínio também está envolvido na transdução de sinal do meio intracelular para o meio extracelular, e vice-versa, promovendo a integração entre estes dois microambientes (SEALS e COURTNEIDGE 2003).

O domínio citoplasmático é capaz de interagir com proteínas da cascata citoplasmática de sinalização intracelular e, possivelmente, com proteínas do citoesqueleto. O comprimento e a sequência de aminoácidos desta região é muito variável entre as diferentes ADAMs. O motivo mais comumente encontrado é PXXP (motivo rico em prolina), que pode funcionar como sítio de ligação para proteínas que contém domínios SH3 (domínio de ligação a motivos ricos em prolina). Este motivo está presente nas ADAMs 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 22, 29 e 33 (SEALS e COURTNEIDGE 2003).

Muitas ADAMs possuem resíduos de serina, treonina e/ou tirosina em sua cauda citoplasmática, os quais consistem em potenciais sítios de fosforilação para diversas quinases. Além de estes aminoácidos poderem regular diretamente a função das ADAMs, os resíduos de fosfotirosina resultantes podem atuar como sítios de ligação para proteínas que contém domínios SH2 (domínio de ligação à fosfotirosina). Estes dados sugerem que os domínios citoplasmáticos das ADAMs podem funcionar como ancoradores de complexos protéicos (SEALS e COURTNEIDGE 2003; EDWARDS et al. 2008).

Alguns trabalhos têm demonstrado que o domínio citoplasmático também participa da regulação da atividade das ADAMs, através da modulação de sua atividade catalítica em resposta a sinais intracelulares (sinalização de dentro para fora), por meio da regulação da transmissão de sinais do meio extracelular para o compartimento intracelular (p.ex., após a interação com substratos ou moléculas de adesão) ou ainda por ter função importante para a organização espacial da proteína, direcionando-a para seu compartimento celular adequado (SEALS e COURTNEIDGE 2003; EDWARDS et al. 2008). WILD-BODE et al. (2006) demonstraram que uma porção rica em prolina no domínio citoplasmático da

ADAM10 é muito importante para sua correta localização basolateral nas células epiteliais polarizadas, conferindo-a a capacidade de clivar E-caderina e promover a migração celular, quando corretamente posicionada.

Figura 1 – Representação esquemática de uma proteína da família ADAM e seus domínios característicos (modificado de PRIMAKOFF e MYLES 2000; SEALS e COURTNEIDGE 2003). No detalhe à direita, estão demonstradas as sequências de aminoácidos do sítio catalítico de algumas ADAMs, sendo as ADAMs 8 e 12 proteínas cataliticamente ativas e a ADAM23 uma proteína que não possui atividade de metaloprotease. No detalhe à esquerda, estão demonstradas as sequências de aminoácidos do *loop* do domínio desintegrina de algumas ADAMs, sendo a ADAM15 o único membro da família que apresenta o motivo RGD neste domínio.

Em relação ao padrão de expressão, relatos da literatura sugerem que as ADAMs são amplamente expressas nos diferentes tecidos humanos e de outros vertebrados, sendo que algumas têm expressão ubíqua nos diferentes tecidos somáticos, enquanto outras são restritas a poucos tecidos, podendo, inclusive, serem expressas exclusivamente ou predominantemente em testículos ou placenta. Contudo, é preciso considerar que, em alguns casos, a expressão de alguns membros desta família ainda não foi sistematicamente estudada e, por isso, não podemos concluir que seja restrita aos tecidos avaliados.

Em consequência de sua complexidade estrutural, as proteínas ADAMs estão envolvidas em inúmeros mecanismos celulares, desde processos biológicos fundamentais, como proliferação, adesão e migração, até em etapas do desenvolvimento, como fertilização, embriogênese, angiogênese, miogênese, neurogênese e diversos aspectos da imunidade. Sendo assim, a desregulação das funções dos diferentes membros desta família pode facilitar o estabelecimento de diversas patologias, como doenças cardiovasculares e neurológicas, asma, infecção, inflamação e câncer (ARRIBAS et al. 2006; MOCHIZUKI e OKADA 2007; EDWARDS et al. 2008; MURPHY 2008).

Nos últimos anos, a participação das proteínas ADAMs nas diferentes etapas da formação e da progressão tumoral tem sido exaustivamente investigada. Alterações no perfil de expressão de diversos membros desta família já foram descritas em inúmeros tipos de tumores, como de mama, próstata, pulmão, estômago, intestino, rim, pâncreas, fígado, bexiga, cabeça e pescoço, cérebro e leucemia, evidenciando a importância destas moléculas para o desenvolvimento tumoral (ARRIBAS et al. 2006; MOCHIZUKI e OKADA 2007; EDWARDS et al. 2008; MURPHY 2008).

Muitas ADAMs cataliticamente ativas estão superexpressas em tumores malignos, como ADAM8, 9, 10, 12, 15, 17, 19 e 28, e contribuem para a proliferação, a migração, a invasão tumoral e/ou a formação de metástases por meio da regulação do processamento de moléculas de superfície (p.ex., fatores de crescimento, citocinas e moléculas de adesão) e de componentes da matriz extracelular, ou ainda através da modulação da atividade de integrinas (ARRIBAS et al. 2006; MOCHIZUKI e OKADA 2007; EDWARDS et al. 2008; MURPHY 2008).

A ADAM9, por exemplo, está superexpressa em diversos tipos de tumores, como de mama, pâncreas, estômago, fígado e melanoma (ARRIBAS et al. 2006; MOCHIZUKI e OKADA 2007). Em camundongos, ADAM9 favorece a progressão de tumores de próstata através da clivagem de ligantes de EGFR e dos receptores FGFR2 (PEDUTO et al. 2005). Em carcinoma de cólon, ADAM9 é secretada por células do estroma adjacente e é capaz de clivar laminina da matriz extracelular e de se ligar às integrinas $\alpha 6\beta 4$ e $\alpha 2\beta 1$ na membrana das células epiteliais tumorais, contribuindo para a invasão da matriz extracelular (MAZZOCA et al. 2005).

O aumento da expressão de ADAM12 foi detectado em vários tipos de tumores, incluindo de mama, cérebro, estômago, intestino e fígado (ARRIBAS et al. 2006; MOCHIZUKI e OKADA 2007). ROY et al. (2004) demonstraram que uma forma solúvel de ADAM12 (ADAM12s) pode ser detectada na urina de pacientes com câncer de mama e que o aumento dos níveis de ADAM12 na urina de pacientes está correlacionado com a progressão tumoral. Neste estudo também foi demonstrado que ADAM12 atua na clivagem de diversos componentes da matriz extracelular, como gelatina, colágeno tipo IV e fibronectina, sugerindo um importante papel desta enzima na degradação da matriz extracelular adjacente, favorecendo a invasão tumoral e a formação de metastástases. Em outro trabalho, KVEIBORG et

al. (2005) demonstraram que a expressão de ADAM12 está diretamente associada a um aumento da resistência à apoptose em células tumorais de mama e, paralelamente, a uma maior sensibilidade à apoptose nas células do estroma, contribuindo para a sobrevivência do tumor.

Em relação às ADAMs humanas cujo domínio de metaloprotease está supostamente inativo, como as ADAMs 22 e 23, alguns trabalhos têm demonstrado que há diminuição de sua expressão nos tumores. D'ABACO et al. (2006) demonstraram que ADAM22 tem alta expressão em cérebro normal, mas está silenciada em gliomas. A diminuição da expressão do gene ADAM23, como veremos de forma detalhada no item 1.3, já foi observada em tumores de mama (COSTA et al. 2004; VERBISCK et al. 2009), de pâncreas (HAGIHARA et al. 2004), de estômago (TAKADA et al. 2005), de intestino (CHOI et al. 2009), de cabeça e pescoço (CALMON et al. 2007) e em gliomas (COSTA et al. 2005).

1.2 O gene ADAM23: estrutura gênica e isoformas de splicing

O gene ADAM23 humano (também denominado MDC3) foi inicialmente identificado por SAGANE et al. (1998) e, posteriormente, o cDNA de camundongo correspondente à ADAM23 foi clonado pelo mesmo grupo (SAGANE et al. 1999). O gene humano está localizado no cromossomo 2 (2q33) e é formado por 27 exons (NM_003812.2) (Figura 2). A proteína ADAM23 é composta por 832 aminoácidos, possui tamanho estimado de aproximadamente 92 kDa e apresenta em sua estrutura todos os domínios característicos dos membros da família ADAM. Entretanto, em decorrência da ausência da sequência consenso de aminoácidos no sítio catalítico do domínio metaloprotease, esta proteína não possui atividade

proteolítica (RAWLINGS e BARRETT 1995) (Figura 1, em detalhe), o que sugere que esteja envolvida preferencialmente no processo de adesão celular.

Em 2004, SUN et al. identificaram duas formas alternativas de splicing do gene ADAM23 expressas em cérebro, denominadas ADAM23 γ e ADAM23 β , que codificam proteínas de tamanho e peso moleculares muito semelhantes ao transcrito identificado anteriormente por SAGANE et al. (1998) (atualmente denominado ADAM23 α). A isoforma ADAM23 γ corresponde a um transcrito que contém todos os domínios extracelulares conservados em sua estrutura, exceto pela ausência de exons que codifiquem o domínio transmembrana (exons 25 e 26 ausentes, Figura 2). Sendo assim, a isoforma ADAM23 γ provavelmente codifica uma isoforma secretada ou citoplasmática da proteína ADAM23. Além disso, ADAM23 γ utiliza um códon de parada diferente da isoforma ADAM23 α e, decorrente disto, apesar de estas duas isoformas apresentarem a mesma sequência de nucleotídeos em suas porções C-terminal, ADAM23 γ possui o último domínio com 46 aminoácidos a mais, em relação ao de ADAM23 α . A comparação entre as sequências de aminoácidos das isoformas revela que ADAM23 γ é 94.5% similar às isoformas α e β (Figura 2D).

A isoforma ADAM23 β apresenta estrutura muito semelhante à da ADAM23 α , com 98% de similaridade entre seus aminoácidos. Entretanto, estas duas variantes possuem domínios transmembranas diferentes, codificados por exons distintos (exon 25 e exon 26, respectivamente, Figura 2), e que possuem apenas 54% de similaridade entre suas sequências de aminoácidos. A diversidade transmembrantar entre as duas isoformas pode ser responsável, por exemplo, por sua localização em sub-regiões ou subdomínios distintos da membrana celular.

Em relação ao domínio C-terminal das isoformas de ADAM23, que constitui o domínio citoplasmático das isoformas α e β , em nenhuma das variantes são

encontrados motivos ricos em prolina (PXXP), que consistem em potenciais sítios de ligação para proteínas que contém domínios SH3. Entretanto, existem diferenças significativas quanto à composição de aminoácidos serina, treonina e tirosina na porção C-terminal das isoformas. Conforme mencionado anteriormente, os resíduos de serina, treonina e tirosina são potenciais sítios de fosforilação para diversas quinases e, além disso, os resíduos de fosfotirosina resultantes podem atuar como sítios de ligação para proteínas que contém domínios SH2. No caso das isoformas α e β , que apresentam a mesma composição de aminoácidos em seus domínios citoplasmáticos, há apenas um resíduo de treonina e os aminoácidos serina e tirosina estão ausentes. Já no domínio C-terminal da isoforma γ , são encontrados sete resíduos de serina e um de tirosina, mas não há resíduos de treonina (Figura 2D). A diferença entre o domínio C-terminal da isoforma γ e o das outras duas isoformas de ADAM23, bem como o fato de ADAM23 γ não estar ancorada à membrana plasmática, sugere que esta isoforma possa estabelecer interações com parceiros moleculares distintos das demais.

Figura 2 – Organização exon/intron do gene ADAM23 humano, suas isoformas de splicing alternativo e estrutura das proteínas codificadas por cada isoforma, de acordo com SUN et al. (2004). **A** – Estrutura do gene ADAM23 (NM_003812.2), mostrando os 27 exons. Na extremidade 3' do gene ADAM23 estão destacados os exons (25-27) envolvidos no processo de splicing. **B** – Desenho esquemático da extremidade 3' do gene ADAM23 demonstrando o splicing. Os exons 25 e 26 codificam os domínios transmembranas das isoformas β e α do gene ADAM23, respectivamente, ambos ausentes na isoforma γ . As linhas coloridas laranja, amarela e verde representam o splicing das isoformas ADAM23 α , β e γ , respectivamente. **C** – Estrutura das isoformas das proteínas ADAM23 e seus respectivos domínios. Na extremidade C-terminal das proteínas, os domínios protéicos estão representados da mesma cor dos exons que os codificam, de acordo com **A** e **B**. **D** –

Sequência de aminoácidos na extremidade C-terminal das isoformas de ADAM23. Os domínios protéicos estão representados da mesma cor de **B** e **C**. Observa-se a diferença entre a composição de aminoácidos dos domínios transmembranas das isoformas α e β , representados em laranja e amarelo, respectivamente. No último domínio, foram destacados os aminoácidos serina (S), treonina (T) e tirosina (Y), potenciais sítios de fosforilação para quinases (triângulo vermelho).

SUN et al. (2004) também avaliaram o padrão de expressão do RNA mensageiro das três variantes de splicing de ADAM23 durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) de camundongos e demonstraram a ocorrência de expressão diferencial entre as etapas avaliadas. ADAM23 γ tem alta expressão em cérebro embrionário e neonatal, mas sua expressão diminui após o nascimento e desaparece logo após o décimo dia pós-natal, estando ausente nos camundongos adultos. Já as isoformas ADAM23 α e β são pouco expressas no início do desenvolvimento embrionário, sua expressão começa a aumentar próximo ao nascimento, crescendo paulatinamente até a idade adulta, quando atinge sua expressão máxima. O padrão de expressão de ADAM23 γ parece coincidir exatamente com o período de formação do SNC, sugerindo uma importante função desta proteína no desenvolvimento cerebral.

É importante ressaltar que no estudo pioneiro de SUN et al. (2004) a avaliação do padrão de expressão do RNA mensageiro das três isoformas de ADAM23 baseou-se no tamanho dos fragmentos gerados, pois foi utilizado um par de iniciadores para amplificar todas as isoformas simultaneamente, os quais foram construídos considerando-se a porção semelhante entre elas. Adotando esta estratégia, foi possível discriminar entre ADAM23 γ e as outras duas variantes, uma vez que o fragmento amplificado desta isoforma apresentava tamanho reduzido, quando comparado aos amplicons das outras duas. Entretanto, não foi possível

analisar separadamente a expressão dos transcritos de ADAM23 α e β , pois seus amplicons apresentavam o mesmo tamanho.

Apesar da existência da isoforma de splicing γ , a presença de uma variante secretada ou citoplasmática da proteína ADAM23 não foi comprovada até o momento. Além disso, o padrão de expressão das três isoformas de splicing do gene ADAM23 foi estudado apenas em cérebro e ainda não foi determinado em outros tecidos normais e em condições patológicas específicas, como o câncer. Por fim, não há trabalhos na literatura que tenham avaliado o papel funcional das três isoformas individual e comparativamente, com o intuito de investigar a importância de cada uma nos mecanismos celulares e em processos biológicos.

Além de ADAM23, outros genes pertencentes a esta família também apresentam splicing alternativo e frequentemente originam transcritos que diferem entre si na região dos exons que codificam os domínios transmembrana e/ou citoplasmático. Os genes ADAM9, 11, 12, 28 e 33 codificam isoformas potencialmente secretadas, sendo que, para ADAM9 e 12, a existência de tais variantes protéicas já foi comprovada (KATAGIRI et al. 1995; GILPIN et al. 1998; ROBERTS et al. 1999; HOTODA et al. 2002; POWELL et al. 2004).

O gene ADAM9, por exemplo, origina dois transcritos, sendo que um deles codifica uma proteína transmembrana, que apresenta todos os domínios típicos das ADAMs, e o outro, uma proteína secretada (ADAM9s), que não possui os domínios transmembrana e citoplasmático (HOTODA et al. 2002). MAZZOCA et al. (2005) demonstraram que o aumento da expressão de ADAM9s está correlacionado com o incremento da capacidade invasiva de carcinomas e com maior potencial metastático.

De modo semelhante a ADAM9, os genes ADAM11 e ADAM12 também apresentam splicing alternativo e codificam uma forma longa, transmembrana, e uma forma curta, secretada (KATAGIRI et al. 1995; GILPIN et al. 1998). KURISAKI et al. (2002) descreveram a existência de uma isoforma curta de ADAM19, denominada ADAM19 mini, em que o pró-domínio e os domínios de metaloprotease e desintegrina estão ausentes, e cuja expressão é exclusivamente intracelular.

No caso dos genes ADAM15 e ADAM22, foram identificadas diversas variantes de splicing que se diferenciam em suas porções C terminal, nos exons que codificam para seus domínios citoplasmáticos, o que sugere que sejam capazes de interagir com proteínas citossólicas distintas (KLEINO et al. 2007; SAGANE et al. 2005). KLEINO et al. (2009) estudaram as isoformas de ADAM15 que possuem domínios citoplasmáticos distintos e que, por isso, exibem diferentes combinações de potenciais sítios de ligação a domínios SH3 (domínio de ligação a motivos ricos em prolina) em sua cauda citoplasmática. Eles demonstraram que estas isoformas exibem grande diversidade na seleção de parceiros moleculares, ou seja, cada isoforma interage com diferentes proteínas que contém domínios SH3, revelando sua participação em vias de sinalização intracelular distintas.

1.3 ADAM23 e seu envolvimento com o câncer

Estudos realizados em nosso laboratório evidenciaram que o gene ADAM23 está frequentemente silenciado em tumores de mama e que seu silenciamento (i.e., ausência de expressão das três isoformas) está relacionado com a progressão tumoral. Inicialmente, COSTA et al. (2004) avaliaram o nível de expressão do RNA mensageiro e o padrão de metilação da região promotora do gene ADAM23 em

linhagens celulares e tumores primários de mama. Foi constatada a hipermetilação do promotor de ADAM23 em 8 de 12 (66,7%) linhagens tumorais de mama e em 9 de 13 (69,2%) tumores primários de mama, sendo que uma maior densidade e frequência de metilação na região promotora deste gene foi verificada em tumores de mama com um estágio mais avançado. Além disso, a presença de metilação na região promotora se mostrou diretamente correlacionada com a diminuição de expressão do gene e da proteína ADAM23, sugerindo que este gene encontra-se epigeneticamente silenciado durante a progressão dos tumores de mama.

A fim de avaliar a importância da hipermetilação do gene ADAM23 no prognóstico do câncer de mama, a análise de metilação foi ampliada para 94 tumores ductais invasivos de mama (VERBISCK et al. 2009). Neste trabalho, o perfil de metilação de duas regiões localizadas a 5' do sítio de início da transcrição do gene ADAM23 foi avaliado através da técnica de MSP (do inglês *Methylation Specific PCR*). A hipermetilação na região 1 do promotor da ADAM23 foi verificada em 31% dos casos e na região 2 em 15% dos casos, sendo que 8.5% dos casos apresentaram hipermetilação nas duas regiões. A presença de metilação nessas regiões foi então associada à evolução da doença e ao desenvolvimento de metástases à distância nas pacientes incluídas no estudo. A análise univariada revelou que pacientes com o gene ADAM23 hipermetilado nas duas regiões tiveram sobrevida livre de metástases à distância (SLM) e sobrevida global específica (SGE) em 5 anos significativamente menor do que as que apresentaram metilação em apenas uma das duas regiões ou não apresentaram ADAM23 hipermetilada (37% versus 74% versus 91%, $p < 0.001$, para SLM e 50% versus 92% versus 93%, $p < 0.001$ para SGE). Em análise multivariada, a hipermetilação deste gene se revelou um fator de prognóstico independente das demais variáveis para a sobrevida

livre de metástases e sobrevida global específica em 5 anos. Pacientes que apresentaram ADAM23 hipermetilada nas duas regiões apresentaram um risco aproximadamente 10 vezes maior de desenvolver metástases à distância e de morrer em decorrência da doença (HR 8.84, IC 95%, 2.31-33.76, $p=0.001$ e HR 9.97, IC 95% 1.96-50.61, $p=0.006$, respectivamente) do que as pacientes que apresentaram apenas uma região hipermetilada (HR 6.53, IC 95%, 2.07-20.57, $p=0.001$ e HR 2.30, IC 95% 0.52-10.07, $p=0.270$, respectivamente) ou ausência de metilação nas duas regiões (grupo referência). Estes resultados demonstram que a hipermetilação do gene ADAM23 está fortemente associada a um pior prognóstico em pacientes com câncer de mama e sugerem que sua expressão no tecido normal possa ter um papel importante na manutenção das propriedades fisiológicas dentro da normalidade.

Além de tumores de mama, a presença de hipermetilação na região promotora do gene ADAM23 e sua correlação com a ausência ou diminuição da expressão gênica também já foi observada em proporções distintas em outros tipos de tumores, como de pâncreas (7/24 tumores, 29%, HAGIHARA et al. 2004), de estômago (7/16 amostras, 44%, TAKADA et al. 2005) e, recentemente, em tumores colorretais (36/76 amostras, 47%, CHOI et al. 2009). A hipermetilação do gene ADAM23 também foi verificada em tumores de cabeça e pescoço (18/43 amostras, 42%), sendo que quando analisados os tumores de laringe separadamente, foi possível constatar uma associação entre a presença de ADAM23 hipermetilada e estadios mais avançados do tumor (estadios 3 e 4) ($p=0.005$), sugerindo um papel importante para ADAM23 na tumorigênese de cabeça e pescoço (CALMON et al. 2007).

Neste contexto, é importante enfatizar que a hipermetilação do gene ADAM23, observada ao longo da progressão dos diversos tipos tumorais descritos acima, envolve, em termos moleculares, a redução global da expressão de ADAM23, ou seja, o silenciamento epigenético atua de forma isoforma-independente. Isto pode ser explicado pelo fato de a região-alvo da hipermetilação, i.e., a região promotora do gene, ser compartilhada pelas três isoformas, uma vez que elas são originadas por splicing alternativo do mesmo locus gênico, conforme descrito no item 1.2 e esquematizado na figura 2. Assim, embora muitos trabalhos tenham associado a hipermetilação de ADAM23 com a progressão tumoral, pouco se pode inferir a partir deles sobre o papel biológico de cada isoforma ao longo do processo tumorigênico.

1.4 ADAM23 e a modulação da atividade de integrinas $\alpha V\beta 3$

Informações sobre interações proteína-proteína fornecem pistas importantes sobre a função biológica e o mecanismo de sinalização de uma determinada proteína.

Uma das primeiras descrições da função biológica de ADAM23 foi apresentada por CAL et al. (2000), que constataram que a proteína ADAM23 α purificada interage com a integrina $\alpha V\beta 3$ em linhagens celulares de neuroblastoma e astrocitoma humanas, e promove adesão específica através de seu domínio desintegrina de modo RGD-independente, uma vez que este motivo está ausente neste membro da família ADAM, sendo substituído por ECD, sequência provavelmente responsável pela ligação com a integrina.

As integrinas são receptores transmembrânicos heterodiméricos envolvidos com a adesão celular e com a transdução de sinal entre os meios extra e

intracelular. São formadas por 24 combinações possíveis entre as duas subunidades – α e β (18 tipos de α e 8 tipos de β) ($\alpha V\beta 3$, $\alpha 2\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$, p.ex.) – que fornecem informações sobre o microambiente, controlam o destino das células através da ligação com proteínas específicas da matriz extracelular ou outros ligantes de superfície celular (p.ex., interação com RTKs - receptores de tirosina quinase) e ativam vias de sinalização intracelulares por meio de sua interação com o citoesqueleto, com algumas quinases e com proteínas envolvidas no controle de morte celular (MIRANTI e BRUGGE 2002).

A maioria das integrinas não está constitutivamente ativa na superfície celular. Sua ativação está relacionada ao seu agrupamento e posicionamento em microdomínios específicos da membrana plasmática, como balsas lipídicas e adesões focais, a associações com outras proteínas de membrana e também a modificações conformacionais de suas subunidades, que expõem seu sítio de ligação extracelular e permitem sua interação com moléculas do citoesqueleto (HYNES 2002; GIANCOTTI e TARONE 2003).

Em vista de sua importância na interação célula-célula e célula-matriz extracelular, e no controle da proliferação e da migração em resposta a fatores de crescimento solúveis e a citocinas, as integrinas exercem papel importante na tumorigênese, estando envolvidas no desenvolvimento de tumores, na invasão de novos tecidos e na formação de metástases. Já está bem estabelecido na literatura que em células neoplásicas há aumento da expressão de integrinas que favorecem sua proliferação, sobrevivência e migração, enquanto as integrinas que exercem efeito contrário, geralmente têm sua expressão diminuída nos tumores (GUO e GIANCOTTI 2004).

Em relação à integrina $\alpha V\beta 3$, diversos relatos da literatura comprovam que sua expressão está alterada em diferentes tipos de tumores, incluindo mama (PIGNATELLI et al. 1992; LIAPIS et al. 1996), próstata (COOPER et al. 2002), ovário (CARREIRAS et al. 1996), melanomas (ALBELDA et al. 1990; NATALI et al. 1997) e gliomas (GINGRAS et al. 1995). Além de células tumorais, já foi demonstrado que $\alpha V\beta 3$ também está expressa em células endoteliais, exercendo papel importante na angiogênese tumoral (BROOKS et al. 1994). Em tumores de mama, o aumento da expressão de $\alpha V\beta 3$ foi correlacionado com tumores invasivos e metástases distantes, o que comprova seu envolvimento com a progressão tumoral (LIAPIS et al. 1996).

Nos últimos anos, muitos trabalhos têm investigado o papel biológico da integrina $\alpha V\beta 3$ na formação de metástases. A integrina $\alpha V\beta 3$ é capaz de se combinar com diversos RTKs, incluindo os receptores para EGF, PDGF, insulina e VEGF, promovendo a migração celular (MIRANTI e BRUGGE 2002; GIANCOTTI e TARONE 2003). FELDING-HABERMANN et al. (2001) demonstraram que a conformação ativa de $\alpha V\beta 3$ na membrana de células tumorais favorece a agregação com plaquetas e promove o sequestro das células tumorais nos capilares sanguíneos, possibilitando a colonização de órgãos distantes e o desenvolvimento de metástases. A ativação de $\alpha V\beta 3$ também está associada com o aumento da atividade da metaloprotease de matriz tipo 9 (MMP-9), favorecendo a migração celular e promovendo ativamente a formação de metástases em tumores de mama (ROLLI et al. 2003).

Uma vez demonstrado que o gene ADAM23 está silenciado epigeneticamente em tumores de mama e que seu silenciamento está relacionado com pior prognóstico, e considerando o envolvimento da integrina $\alpha V\beta 3$ com a progressão de

tumores de mama, nosso grupo tem procurado elucidar o papel biológico de ADAM23, sua relação causal com a tumorigênese da mama e a importância da interação entre ADAM23 e a integrina $\alpha V\beta 3$ neste processo.

A fim de investigar os possíveis papéis de ADAM23 durante a progressão tumoral, em nosso laboratório o gene ADAM23 foi silenciado na linhagem tumoral MDA-MB-435 através da técnica de interferência de RNA, utilizando um *short hairpin RNA*, ou shRNA, que alvejava uma região comum às três isoformas de ADAM23. A linhagem MDA-MB-435 foi utilizada neste estudo porque expressa níveis elevados da integrina $\alpha V\beta 3$ e por consistir em um modelo amplamente utilizado para o estudo da ativação desta integrina (FELDING-HABERMANN et al. 2001; ROLLI et al. 2003). Após a seleção dos clones que exibiam o completo silenciamento do gene ADAM23 (i.e., silenciamento das três isoformas de splicing), foram realizados ensaios funcionais com o objetivo de avaliar os efeitos da ausência de ADAM23 nas células tumorais em diferentes processos celulares que pudessem ser correlacionados com um fenótipo tumoral mais agressivo.

Inicialmente, nosso grupo demonstrou que ADAM23 interage diretamente com a integrina $\alpha V\beta 3$ na linhagem tumoral MDA-MB-435 (VERBISCK et al. 2009), confirmando que a interação entre estas duas proteínas, descrita originalmente em linhagens celulares de neuroblastoma e astrocitoma humanas (CAL et al. 2000), também ocorre neste modelo de estudo. A partir daí, foram realizados ensaios funcionais com o objetivo de avaliar a importância desta interação para a progressão tumoral.

Primeiramente, foram realizados ensaios de migração *in vitro* pelo método de migração em *transwells* utilizando a vitronectina, o ligante clássico da integrina $\alpha V\beta 3$ (CLEGG et al. 2003), como agente haptotático. Foi observado que as células que

não expressavam as três isoformas de ADAM23 (shRNA-04 e shRNA-25), denominadas a partir deste momento A23neg (células MDA-MB-435 ADAM23 negativas), apresentaram aumento de 4 vezes em sua capacidade migratória, em relação às células parentais ou às células transfectadas com o vetor vazio (controle). O aumento da capacidade migratória das células A23neg foi significativamente inibido por um anticorpo monoclonal bloqueador de função específico para a integrina $\alpha V\beta 3$, o que confirma que o aumento da migração é mediado especialmente por esta integrina (VERBISCK et al. 2009).

Em seguida, foram realizados ensaios de adesão à vitronectina que demonstraram que células A23neg possuem capacidade de adesão aproximadamente 3 vezes maior do que as células parentais não transfectadas ou transfectadas com o vetor vazio (controle). A adesão celular de células A23neg foi bloqueada significativamente pelo peptídeo RGD, um bloqueador geral de integrinas, e pelo anticorpo monoclonal LM609, um bloqueador de função específico para a integrina $\alpha V\beta 3$, confirmando que o aumento da afinidade por vitronectina nas células que não expressam ADAM23 é mediado principalmente por esta integrina (VERBISCK et al. 2009).

Apesar da interação entre ADAM23 e outras integrinas não ter sido descrita na literatura até o momento, resultados obtidos em nosso laboratório em experimentos funcionais sugerem que a proteína ADAM23 também possa interagir e modular a atividade de outras duas integrinas, $\alpha V\beta 5$ e $\alpha 2\beta 1$. Em ensaios de adesão à vitronectina, ligante preferencial de $\alpha V\beta 5$, em que foi utilizado o anticorpo monoclonal P1F6, capaz de bloquear especificamente a função desta integrina, foi observada uma redução significativa da adesão das células A23neg, resultado semelhante ao obtido com o anticorpo anti- $\alpha V\beta 3$, LM609. A combinação dos

anticorpos anti- $\alpha V\beta 3$ e anti- $\alpha V\beta 5$ foi capaz de abolir completamente a adesão de A23neg à vitronectina, comprovando que estas duas integrinas participam conjuntamente do aumento da afinidade por vitronectina verificado nas células que não expressam ADAM23 (VERBISCK et al. 2009).

Em ensaios de adesão e migração em substrato de colágeno tipo-I, ligante preferencial da integrina $\alpha 2\beta 1$, foi observado aumento de 4 vezes da capacidade adesiva e de 2.5 da capacidade migratória das células A23neg, em relação às células-controle. A utilização de um anticorpo anti- $\alpha 2\beta 1$, capaz de bloquear especificamente a função desta integrina, comprovou que a migração para o colágeno tipo-I é mediada principalmente pelas integrinas $\alpha 2\beta 1$ e independente de integrinas do tipo αV , sugerindo que ADAM23 também possa estar envolvida na modulação da atividade de $\alpha 2\beta 1$ (dados não publicados do Dr. Érico T. Costa).

Utilizando um anticorpo monoclonal que reconhece especificamente a forma ativada de $\beta 3$ (AP5), nosso grupo também demonstrou que em células A23neg há um aumento da representação das integrinas $\alpha V\beta 3$ na sua conformação ativa na superfície celular, quando comparadas às células que expressam ADAM23 (VERBISCK et al. 2009).

Por fim, foram realizados ensaios de “sequestro” pulmonar (do inglês, *lung arrest*) em que foram injetadas células parentais MDA-MB-435, seus derivados transfectados com o vetor vazio ou seus derivados A23neg na veia lateral caudal de camundongos CB-17/SCID a fim de avaliar a existência de diferenças na capacidade adesiva entre estas células nos pulmões dos animais. Os resultados observados evidenciaram uma maior quantidade de células A23neg sequestradas e aderidas no pulmão dos animais, o que reflete uma maior aderência celular *in vivo* na ausência de ADAM23, sugerindo uma maior capacidade metastática destas células

(VERBISCK et al. 2009). Estes resultados confirmaram o envolvimento do gene ADAM23 no controle da progressão dos tumores de mama e, mais especificamente, em etapas iniciais do processo de formação de metástases.

1.5 Outros parceiros moleculares de ADAM23

Além da integrina $\alpha V\beta 3$, recentemente foram identificadas outras três moléculas capazes de interagir com ADAM23. Duas delas são membros da família LGI (*Leucine-rich glioma inactivated*), LGI1 e LGI4, que possuem sequências bastante semelhantes entre si e são proteínas secretadas, muito importantes para o desenvolvimento do sistema nervoso (SAGANE et al. 2008). Neste trabalho, foi demonstrado que, além de ADAM23, as ADAMs 11 e 22 também são capazes de se ligar a LGI1 e LGI4 em cérebro de camundongos. As ADAMs 11 e 22 são muito semelhantes a ADAM23 em suas porções extracelulares e também são cataliticamente inativas (NOVAK 2004). Posteriormente, OWUOR et al. (2009) demonstraram que a interação ADAM23-LGI1 é fundamental para o crescimento de neuritos mediada por LGI1 *in vitro* e também para a arborização dendrítica.

Em outro estudo, COSTA et al. (2009) demonstraram que a proteína ADAM23 e a proteína príon celular (PrPC) se co-localizam na membrana plasmática de neurônios hipocâmpais de camundongos e em linhagens celulares de neuroblastoma humano e de camundongo. Ensaio *in vitro* sugeriram a existência de interação direta entre o domínio desintegrina de ADAM23 e PrPC recombinante ou endógena no sistema nervoso central (COSTA et al. 2009).

Sabe-se que ADAM23 tem expressão elevada em cérebro e que é expressa predominantemente como uma proteína de superfície, localizada principalmente em

sítios de contato intercelular, o que sugere que esteja envolvida com a adesão celular (SAGANE et al. 1998; NOVAK 2004; GOLDSMITH et al. 2004). Sabe-se também que camundongos nocautes para ADAM23 apresentam tremores e ataxia e sobrevivem no máximo 15 dias após o nascimento (MITCHELL et al. 2001).

Em conjunto, estes dados evidenciam que a ADAM23 tem papel fundamental no desenvolvimento e no funcionamento do sistema nervoso central e que, provavelmente, exerce sua função através da interação com diferentes moléculas de adesão célula-célula e/ou célula-matriz extracelular.

1.6 ADAM23 e o controle da proliferação e da invasão de células tumorais

Recentemente, um novo estudo conduzido em nosso laboratório revelou que ADAM23 exerce um efeito mais amplo sobre o fenótipo de células tumorais, sendo capaz de modular tanto a proliferação quanto o comportamento invasivo em condições específicas de cultivo (sistemas de cultura celular tridimensionais ou 3-D) (COSTA et al. 2012, em fase de elaboração).

Utilizando estruturas 3-D denominadas de esferóides multicelulares (MS, do inglês *multicellular spheroids*), formados por agregação espontânea de células tumorais MDA-MB-435 ou de seus derivados A23neg, foram avaliados os efeitos de ADAM23 no controle da proliferação celular pelo método de incorporação de timidina tritiada (3H-TdR) ou bromo-deoxiuridina (BrdU) no DNA das células cultivadas em MS. Diferentemente do observado em culturas bidimensionais (i.e., em monocamada), nas quais ADAM23 não demonstrou nenhum efeito sobre as taxas de proliferação celular (VERBISCK et al. 2009), a avaliação da proliferação em um modelo 3-D revelou que os esferóides formados por células com ausência de

expressão de ADAM23 (A23neg) possuem uma taxa de proliferação 30-40% menor do que os esferóides formados pelas células parentais MDA-MB-435 ou por células transfectadas com o vetor vazio (controle) ($p=0.002$).

A diferença na capacidade de proliferação verificada entre os esferóides multicelulares foi ainda maior quando, previamente à incorporação de 3H-TdR, os esferóides foram transferidos para uma matriz 3-D de colágeno do tipo I, que propicia suporte tridimensional para a adesão celular e resistência física para os esferóides em crescimento. Neste caso, observou-se uma diminuição de 45-50% ($p=0.006$) da proliferação das células A23neg, quando comparadas aos esferóides formados por células-controle. Em seguida, ensaios *in vitro* demonstraram que a diminuição da capacidade proliferativa decorrente da ausência de expressão de ADAM23 é estritamente dependente do contato íntimo célula-célula, ou seja, ADAM23 medeia a proliferação através de sinalização juxtácrina (COSTA et al. 2012, em fase de elaboração).

Experimentos de clonogênese independente de ancoragem (soft-ágar) confirmaram a importância da expressão de ADAM23 para a proliferação celular em condições 3-D, nas quais o contato célula-célula é naturalmente favorecido. Nestes ensaios, foi observado que o silenciamento de ADAM23 na linhagem MDA-MB-435 não altera a quantidade de colônias formadas, indicando que a expressão de ADAM23 não está relacionada com a modulação de vias de sobrevivência celular, mas que seu silenciamento reduz significativamente a proliferação celular, ocasionando uma drástica redução no tamanho das colônias obtidas quando comparadas ao das células ADAM23-positivas.

Em ensaios paralelos, COSTA et al. investigaram a capacidade de invasão destas células em um modelo no qual os esferóides multicelulares foram embebidos

em uma matriz 3-D de colágeno-I e a invasão das células através da matriz adjacente foi monitorada durante vários dias (15-20 dias). Verificou-se que os esferóides formados por células A23neg possuem um aumento de 2.6 vezes na sua velocidade de invasão, em relação aos esferóides formados pelas células-controle ($p < 0.0001$), demonstrando que a expressão de ADAM23 regula negativamente a capacidade invasiva das células tumorais.

Em resumo, estes resultados demonstram que ADAM23 exerce um efeito pleiotrópico em células tumorais MDA-MB-435, sendo a presença de ADAM23 capaz de modular positivamente a proliferação celular e negativamente a capacidade invasiva destas células.

Embora o trabalho de COSTA et al. não discrimine, dentre os efeitos propostos para ADAM23, o papel biológico de cada uma de suas três isoformas, a complexidade da função biológica observada para ADAM23 é compatível com a possibilidade de que as isoformas atuem diferencialmente no controle de mecanismos moleculares específicos e que a expressão diferencial entre elas possa modular mecanismos moleculares fundamentais, que atuem de forma alternada entre sinais pró-proliferativos e pró-invasivos.

Esta hipótese torna-se ainda mais plausível em vista das informações disponíveis na literatura que demonstram a existência de expressão diferencial entre as isoformas de ADAM23 durante o desenvolvimento do SNC (SUN et al. 2004). Sabe-se que a migração neuronal é a etapa mais importante para a formação da rede de neurônios, e interações célula-célula e célula-matriz extracelular têm papel fundamental neste processo. Considerando a expressão elevada de ADAM23 em cérebro (SAGANE et al. 1998; NOVAK 2004; GOLDSMITH et al. 2004) e sua associação com integrinas $\alpha V\beta 3$ (CAL et al. 2000; VERBISCK et al. 2009), ADAM23

poderia modular parte destas interações através de sua ligação com as integrinas. Como demonstrado por SUN et al., a isoforma γ é altamente expressa no SNC durante os períodos embrionário e neonatal, mas sua expressão diminui drasticamente após o nascimento e está ausente nos camundongos adultos. Já as isoformas ADAM23 α e β são pouco expressas no início do desenvolvimento embrionário e têm alta expressão na idade adulta.

Curiosamente, o padrão de expressão da subunidade αV de integrinas no SNC é muito semelhante ao de ADAM23 γ (HIRSCH et al. 1994). Estes dados sugerem que, de alguma forma, a interação entre ADAM23 γ e integrinas αV seja importante para o desenvolvimento cerebral. É possível que a isoforma γ esteja competindo com as outras duas isoformas pela ligação a αV durante este processo, prevenindo a associação entre as integrinas e outros ligantes, e modulando as interações célula-célula e célula-matriz extracelular.

Assim como verificado no SNC, é possível que as isoformas de ADAM23 estejam diferencialmente expressas em outros tecidos normais e exerçam papéis biológicos distintos em diferentes processos biológicos e patológicos. Entretanto, até o momento, as funções individuais de cada isoforma, assim como estudos avaliando seus respectivos padrões de expressão, permanecem pouco explorados.

2 OBJETIVOS

- Avaliar a existência de expressão diferencial das isoformas de splicing α , β e γ do gene ADAM23 em um painel de linhagens tumorais derivadas de diferentes tipos de tumores e em amostras de tecidos normais correspondentes.
- Silenciar a expressão de cada uma das isoformas de splicing do gene ADAM23 individualmente de forma específica e estável na linhagem tumoral de mama MDA-MB-435 utilizando a metodologia de interferência de RNA (RNAi).
- Avaliar o impacto do silenciamento da expressão de cada isoforma sobre a capacidade de proliferação, clonogênese, adesão e espraiamento celular da linhagem MDA-MB-435, a fim de caracterizar a função individual de cada isoforma do gene ADAM23.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares tumorais e amostras de RNA de tecidos normais

As linhagens celulares tumorais MDA-MB-435, MDA-MB-436, HCC1599, COLO320DM, COLO320HSR, U87MG, Du145, LNCap, PC-3, BxPC-3, HPAC e MIA PaCa-2 foram obtidas da *American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)*. As culturas foram mantidas a 37°C em uma atmosfera úmida com 5% CO₂ e 95% de ar (estufa de CO₂ - *Forma Scientific*).

Além destas linhagens celulares, também foram utilizadas amostras de RNA provenientes de tecidos normais de mama, cólon, cérebro, próstata e pâncreas obtidas comercialmente da *Clontech*. Estas amostras consistem em um pool de RNAs extraídos de tecidos normais adultos de diferentes doadores.

3.2 Reagentes e soluções empregados na cultura de células

As linhagens celulares MDA-MB-435, MDA-MB-436, HCC1599, COLO320DM, COLO320HSR, Du145, LNCap, e BxPC-3 foram cultivadas em meio RPMI (RPMI-1640, *Gibco*), acrescido de 10% soro fetal bovino (SFB) (*Cultilab*) (condição referente a *meio de cultura completo*). A linhagem U87MG foi cultivada em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco*), acrescido de 10% SFB. A linhagem PC3 foi cultivada em meio RPMI acrescido de 10% SFB e 1% piruvato de sódio. A linhagem HPAC foi cultivada em meio DMEM Ham's F12 (*Gibco*) acrescido de 1.2g/L bicarbonato de sódio, 2.5mM L-glutamina, 15mM HEPES, 0.5mM piruvato

de sódio, 2µg/ml insulina, 5µg/ml transferrina, 40ng/ml hidro cortisona, 10ng/ml fator de crescimento epidermal e 5% SFB. A linhagem MIA PaCa-2 foi cultivada em meio DMEM acrescido de 10% SFB e 2.5% soro eqüino.

Também foram utilizados os seguintes reagentes na cultura de células: tripsina (solução 0,1% em PBSA e 1mM EDTA), tampão fosfato (PBS) (2.7mM KCl, 137mM NaCl, 8mM Na₂PO₄ anidro, 1.5mM KH₂PO₄, 0.68mM CaCl₂.2H₂O e 0.49mM MgCl₂.6H₂O, pH 7.2), tampão fosfato com EDTA (0.5 mM) e Trypan Blue (solução 0.5% em solução 0.9% NaCl).

3.3 Extração de RNA das linhagens celulares

O RNA total das linhagens celulares tumorais empregadas na análise do padrão de expressão das três isoformas de ADAM23 e da linhagem MDA-MB-435 não-transfectada (WT), de seus derivados expressando shRNAs α , β ou γ ou o vetor pAVU6+27 vazio, e de células MDA-MB-435 transfectadas com duplexes sintéticos de RNAi foram extraídos com o reagente TRIzol[®] (*Invitrogen*), segundo as especificações do fornecedor.

Após a extração, o RNA total obtido foi quantificado em espectrofotômetro e sua integridade foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1%. Foram considerados íntegros os RNAs que apresentaram as bandas correspondentes aos RNAs ribossômicos 28S e 18S bem evidentes, tendo a primeira o dobro da intensidade da segunda. Os RNAs foram armazenados em freezer -80°C.

3.4 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada empregando-se o sistema da *SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen)*. Dois microgramas de RNA total foram transcritos reversamente à primeira fita de cDNA na presença de 200U da enzima transcriptase reversa (*Superscript III, Invitrogen*), utilizando 250ng do iniciador oligo (dT) e 50ng de random primers (*Invitrogen*) em uma reação com volume final de 20µl contendo tampão 1X da transcriptase reversa, 40U de inibidor de RNase (RNase OUT, *Invitrogen*), 5mM de DTT e 500µM da mistura de todos os dNTPs. Inicialmente, uma mistura contendo RNA, água, dNTPs e iniciadores foi incubada a 65°C por 5 minutos para abertura de possíveis estruturas secundárias nas moléculas de RNA. Em seguida, foram adicionados à mistura os demais reagentes e esta foi incubada a 25°C por 10 minutos, seguindo-se a síntese de cDNA a 50°C por 60 minutos. Por fim, a inativação da enzima foi conduzida a 72°C por 15 minutos.

A eficiência da síntese de cDNA foi verificada por meio da amplificação do gene NOTCH2 [*Homo sapiens* Notch homolog 2 (*Drosophila*), NM_024408.2], cujo mRNA possui 11.433 pb, utilizando iniciadores específicos para a amplificação de um fragmento deste gene localizado próximo à sua extremidade 5', a uma distância de 10.691 pb de sua cauda poliA. Uma vez que a síntese de cDNA é feita na direção da extremidade 3' para a extremidade 5' do gene, a amplificação de um fragmento localizado próximo à extremidade 5' do gene indica a integridade do RNA utilizado na síntese. Nas reações de amplificação do gene NOTCH2, 1µl de cDNA diluído 10 vezes foi utilizado em reações com volume final de 20µl contendo 1X tampão de Taq Polimerase (*Invitrogen*), 1.5mM MgCl₂, 200µM dNTPs, 1U Taq polimerase (*Invitrogen*) e 0.4µM de iniciadores específicos. As condições de amplificação foram:

desnaturação do cDNA por 5 minutos a 94°C e, em seguida, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final, foi realizado 1 ciclo de extensão das moléculas por 6 minutos a 72°C. As seqüências correspondentes aos iniciadores utilizados para amplificar o gene NOTCH2 foram: *forward* (5' CCA ACC AGT TCT CCT GC 3') e *reverse* (5' GTG GTT AGG GCA GTC ATC 3').

3.5 Reações de amplificação em tempo real

O padrão de expressão das três isoformas do gene ADAM23 foi avaliado nas linhagens celulares, nas amostras de tecidos normais, nos derivados da linhagem MDA-MB-435 expressando shRNAs isoforma-específicos ou o vetor pAVU6+27 vazio, e nas amostras de MDA-MB-435 transfectadas com duplexes de RNAi, através de reações de PCR em tempo real. A detecção do produto formado durante a reação de amplificação foi realizada empregando-se o reagente *SYBR[®] Green Dye* (*Applied Biosystems*) e as reações foram realizadas em termociclador *ABI Prism[®] 7300 Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*).

Os iniciadores específicos para amplificar cada uma das três isoformas do gene ADAM23 foram desenhados manualmente, considerando-se os parâmetros sugeridos pela empresa *Applied Biosystems* para maior eficiência das reações. Foram desenhados um iniciador *forward* e dois *reverse* para cada isoforma. Os iniciadores *forward* foram posicionados na junção dos exons codificados diferencialmente por cada isoforma, a fim de assegurar a especificidade da amplificação. Na tabela 1 estão demonstradas as seqüências dos iniciadores específicos testados durante a padronização das reações de amplificação de cada

variante da ADAM23. Também estão descritas as sequências dos iniciadores empregados para amplificar os genes endógenos HMBS e PUM1, utilizados como normalizadores das reações de amplificação em tempo real.

Tabela 1 – Sequência dos iniciadores específicos utilizados para amplificar as isoformas α , β e γ do gene ADAM23 individualmente, e os genes endógenos HMBS e PUM1, empregados como normalizadores das reações de amplificação em tempo real. Estão destacados em negrito os iniciadores *reverse* escolhidos para analisar a expressão de cada isoforma, após a padronização das reações. Na última coluna está demonstrada a concentração final dos iniciadores *forward* (pF) e *reverse* (pR) utilizada para amplificar cada um dos fragmentos.

Amplicon	Primer <i>Forward</i>	Primer <i>Reverse</i>	[pF + pR]
ADAM23 α	5' GATGAAGGACCCAAGGGT 3'	(R1) 5' TTAATAGTTCCAGTAACACTGC 3' (R2) 5' AGGACAATAGCTGCTACCAGGAT 3'	400 nM
ADAM23 β	5' GATGAAGGACCCAAGGTG 3'	(R1) 5' TTAATAGTTCCAGTAACACTGC 3' (R2) 5' CAGGGCCAGAATGGTGC 3'	400 nM
ADAM23 γ	5' GATGAAGGACCCAAGGAAA 3'	(R1) 5' TTAATAGTTCCAGTAACACTGC 3' (R2) 5' CCCAGAATCCAACAGTGCAA 3'	400 nM
HMBS	5' GGCAATGCGGCTGCAA 3'	5' GGGTACCCACGCGAATCAC 3'	300 nM
PUM1	5' CCAGGCCAGCGGAAGAT 3'	5' TGTACTTACGAAGAGTTGCGATGTG 3'	200 nM

A especificidade dos iniciadores utilizados para amplificar cada isoforma de splicing do gene ADAM23 foi confirmada através do sequenciamento do produto amplificado por cada par de iniciadores e por testes de amplificação cruzada, ou seja, reações em que foram utilizados os iniciadores para amplificar uma das isoformas e fragmentos de DNA purificados correspondentes às outras duas isoformas como molde. Por exemplo, para avaliar a especificidade dos iniciadores que amplificam ADAM23 α , utilizamos fragmentos das isoformas β e γ . Por meio destes testes, constatamos que os três pares de iniciadores eram 100% específicos para suas isoformas-alvo, ou seja, não amplificavam as outras duas isoformas,

mesmo quando utilizamos um excesso (10^6 cópias) de DNA das isoformas não-alvo e um alto número de ciclos de amplificação.

Foi utilizado 100ng de cDNA nas reações de avaliação do padrão de expressão das isoformas de ADAM23 nas linhagens tumorais e nos tecidos normais. Este experimento foi realizado três vezes e, em cada experimento, a análise da expressão de cada gene de interesse nas diferentes amostras foi feita em duplicata.

Nas reações para analisar a expressão das variantes de ADAM23 em amostras provenientes da linhagem MDA-MB-435 não-transfectada (WT), transfectada com duplexes sintéticos de RNAi ou em amostras de seus derivados transfectados com o vetor pAVU6+27 contendo os shRNAs α , β ou γ , ou com o vetor vazio, utilizou-se 10ng de cDNA. Cada um destes ensaios foi realizado duas vezes, sendo que, para cada experimento, as amostras foram coletadas em dias distintos e as reações foram feitas em duplicata.

Em todas as reações foi utilizado 10 μ l de *SYBR[®] Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) e para cada amplicon utilizou-se uma concentração final determinada de primers *forward* e *reverse*, como descrito na tabela 1. As condições de amplificação foram: incubação do cDNA por 2 minutos a 50°C e desnaturação por 10 minutos a 95°C, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Ao final de cada reação de amplificação, analisou-se a curva de dissociação dos produtos amplificados para avaliar a especificidade da reação e a amplificação de fragmentos inespecíficos.

3.6 Avaliação da expressão gênica pelo método de quantificação relativa

Para a análise da expressão das isoformas de ADAM23 na linhagem MDA-MB-435 não-transfectada (WT), transfectada com duplexes de RNAi e em seus derivados expressando os shRNAs α , β ou γ , ou o vetor pAVU6+27 vazio, a expressão diferencial de cada transcrito foi avaliada pelo método de quantificação relativa, em que a expressão do gene de interesse é comparada à expressão de um gene endógeno (controle), utilizado como normalizador. Nesta parte do trabalho, o gene HMBS (*Homo sapiens* hydroxymethylbilane synthase, variante 1, NM_000190), foi utilizado como controle endógeno. As sequências dos iniciadores específicos utilizados para amplificar o gene HMBS estão demonstradas na tabela 1 e correspondem aos mesmos iniciadores utilizados por VANDESOMPELE et al. (2002).

As reações de amplificação de HMBS foram conduzidas de modo semelhante às reações de amplificação das variantes de ADAM23, utilizando-se a mesma quantidade de cDNA (10ng). Para cada amostra em análise, as reações para o gene HMBS também foram feitas em duplicata. A comparação da expressão gênica nas diferentes amostras foi realizada através da comparação entre os C_T s (*Cycle Threshold*), que corresponde ao ciclo da reação no qual a fluorescência da amostra intercepta o *threshold*, ou limiar em que a intensidade da fluorescência emitida é estatisticamente diferente da fluorescência de fundo (*background*) e a curva encontra-se na fase logarítmica de amplificação.

Para o cálculo da expressão diferencial pelo método de quantificação relativa foi utilizado o modelo matemático proposto por PFAFFL (2001):

$$R = (E \text{ alvo})^{\Delta C_T \text{ alvo}} / (E \text{ normalizador})^{\Delta C_T \text{ normalizador}}$$

em que ***E alvo*** corresponde à eficiência de amplificação dos iniciadores específicos para o transcrito-alvo, ***E normalizador*** corresponde à eficiência de amplificação dos iniciadores específicos para o gene normalizador, **$\Delta C_T \text{ alvo}$** corresponde à diferença entre o C_T do transcrito-alvo obtido para a amostra referência e o C_T do transcrito-alvo obtido para a amostra em análise, **$\Delta C_T \text{ normalizador}$** corresponde à diferença entre o C_T do gene endógeno obtido para a amostra referência e o C_T do gene endógeno obtido para a amostra em análise.

Para avaliar o impacto dos duplexes sintéticos de RNAi ou dos shRNAs α , β ou γ na expressão gênica de cada isoforma de ADAM23 utilizamos como amostra referência a linhagem MDA-MB-435 não-transfectada (WT).

Previamente às reações com as amostras de interesse, foram calculadas as eficiências de amplificação dos iniciadores específicos para cada variante do gene ADAM23 e para o gene normalizador HMBS empregando-se a seguinte fórmula:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})}$$

em que, o ***slope*** corresponde à inclinação da reta obtida quando se analisa a variação do C_T dos transcritos-alvo ou do normalizador em função do *log* de diferentes quantidades de cDNA. Para tanto, foram utilizadas 3 concentrações diferentes de cDNA obtidas por meio da diluição seriada da amostra de cDNA original. Para as isoformas de ADAM23, que são genes de baixa expressão celular em relação aos genes endógenos, as quantidades de cDNA utilizadas para construir

a curva de eficiência foram 10, 100 e 250ng; já para os normalizadores HMBS e PUM1, utilizou-se 1, 10 e 100ng de cDNA.

3.7 Avaliação da expressão gênica pelo método de quantificação absoluta

A existência de expressão diferencial das isoformas α , β e γ do gene ADAM23 em linhagens tumorais e em amostras de tecidos normais, bem como a expressão das isoformas nos derivados clonais da linhagem MDA-MB-435 utilizados nos ensaios funcionais (VV1, VV2, A8, A10, B2, B5, G25, G40 e A23neg), foram avaliadas pelo método de quantificação absoluta, que determina o número de cópias do transcrito de interesse na amostra em análise por meio da comparação com uma curva padrão construída com quantidades conhecidas do transcrito-alvo.

Nesta parte do estudo, além do gene HMBS, incluímos outro controle endógeno, o gene PUM1 [*Homo sapiens* pumilio homolog 1 (*Drosophila*), variante 1, NM_001020658], cujos iniciadores foram desenhados manualmente em nosso laboratório e estão demonstrados na tabela 1 (página 55, de *Material e Métodos*).

Para tanto, fragmentos das três isoformas do gene ADAM23 e dos controles endógenos HMBS e PUM1 foram amplificados a partir de cDNA da linhagem MDA-MB-435 nas mesmas condições da reação de amplificação em tempo real, purificados e clonados empregando-se o kit *pGEM T Easy*[®] (*Promega*), seguindo as instruções do fornecedor. O produto de ligação foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* (DH10B) eletrocompetentes (SAMBROOK e RUSSEL 2001), as quais foram selecionadas em placas contendo 40 μ g/ml X-gal, 24 μ g/ml IPTG e 100 μ g/mL ampicilina. A presença do inserto foi verificada através de reações de amplificação com iniciadores específicos para sequências do vetor de clonagem. Os

produtos das reações foram analisados por eletroforese e uma colônia contendo cada um dos fragmentos de interesse foram inoculadas em 2ml de meio de cultura Circle Grow (*Bio 101, Inc.*) contendo 100µg/ml ampicilina e deixadas em shaker a 37°C durante a noite. No dia seguinte, após a obtenção do pellet celular, realizou-se a extração de DNA plasmidial, utilizando-se o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)*, seguindo as especificações do fornecedor. Os produtos da extração foram analisados por eletroforese e quantificados em espectrofotômetro, seguindo-se o sequenciamento para confirmação dos fragmentos clonados. O sequenciamento foi realizado segundo a técnica de terminação com dideoxinucleotídeos descrita por SANGER et al. (1977), utilizando-se o kit *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences)*, seguindo as instruções do fornecedor. Os produtos do sequenciamento foram submetidos a eletroforese por capilaridade no sequenciador automático de DNA *ABI 3100 (Applied Biosystems)*.

Uma vez confirmada a presença dos fragmentos de interesse nos plasmídeos purificados e sequenciados, estas amostras foram utilizadas para re-amplificar cada um dos fragmentos. Nas reações de re-amplificação, aproximadamente 100.000 cópias de cada plasmídeo foram utilizadas como molde em reações com volume final de 20µl contendo 1X tampão Taq Polimerase (*Invitrogen*), 1.5mM MgCl₂, 200µM dNTPs, 1U Taq polimerase (*Invitrogen*) e os mesmos iniciadores específicos utilizados nas reações de amplificação em tempo real para amplificar cada fragmento, de acordo com a sequência e a concentração dos iniciadores descritas na tabela 1. As condições de amplificação foram: desnaturação do cDNA por 5 minutos a 94°C e, em seguida, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final, foi realizado 1 ciclo de extensão das moléculas por 6 minutos a 72°C.

Os produtos das reações de re-amplificação foram analisados por eletroforese em gel de L.M.P. agarose 3% (*Low Melting Point Agarose, GibcoBRL*). Em seguida, os fragmentos foram extraídos do gel utilizando-se o kit *QIAquick Gel Extraction (QIAGEN)*. As concentrações dos produtos amplificados e purificados foram analisadas no fluorímetro *Qubit (Invitrogen)*, empregando-se o kit *Quant-iT double strand DNA High Sensitivity Assay (Invitrogen)*. Cada amostra foi quantificada em duplicata, e a média dos valores obtidos para cada uma delas foi utilizada para calcular o número de moléculas existente em cada microlitro de solução.

Para determinar exatamente o número de cópias de cada transcrito que era colocado na reação de amplificação, foi feito o cálculo da massa de uma molécula a partir do tamanho e da composição de bases de cada fragmento clonado. Após a obtenção da massa de 1 molécula, calculou-se o volume necessário de cada solução dos produtos amplificados para se obter 1, 10, 100, 1.000, 10.000 (...) moléculas em cada reação de amplificação. Foram feitas diluições seriadas a fim de se obter as concentrações para os diferentes pontos na curva de amplificação padrão. Após alguns testes, optou-se por construir a curva com cinco ordens de magnitude, utilizando os seguintes pontos: 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 moléculas. A diluição dos produtos de PCR em uma solução contendo 20ng/ μ l de um DNA plasmidial facilitou a obtenção de duplicatas idênticas nos pontos utilizados para a construção da curva-padrão, principalmente nas reações realizadas com as menores quantidades de moléculas, como 100 e 1.000, cujos produtos amplificam em C_T s muito altos.

A curva-padrão foi realizada simultaneamente às reações de amplificação nas amostras de interesse todas as vezes em que estas foram conduzidas. Dessa forma, a quantidade de cópias do transcrito de interesse na amostra analisada foi obtida

plotando-se o C_T da amostra na curva-padrão construída com quantidades conhecidas do transcrito. Ao final de cada reação de amplificação, analisou-se a correlação entre os pontos utilizados para construir a curva-padrão. Apenas as curvas que apresentaram coeficiente de correlação linear (R^2) entre os pontos maior do que 0.995 e eficiência de amplificação (demonstrada pelo *slope* da curva, $E=10^{(-1/\text{slope})} - 1$) maior do que 95% foram incluídas na análise. Por fim, o número de cópias obtido para o transcrito de interesse foi normalizado pela média entre o número de cópias dos transcritos dos genes endógenos HMBS e PUM1, a fim de normalizar a quantidade e a qualidade do cDNA nas diferentes amostras.

3.8 Desenho dos duplexes para interferência de RNA (RNAi)

A metodologia escolhida para caracterizar funcionalmente as isoformas de splicing α , β e γ do gene ADAM23 foi o silenciamento da expressão de cada isoforma individualmente, através de interferência de RNA (RNAi).

Neste mecanismo, após a introdução de uma molécula dupla-fita de RNA no interior de uma célula, a enzima Dicer, pertencente à família das ribonucleases III (RNase III), cliva a dupla-fita de RNA em pequenos fragmentos de aproximadamente 21-25 nucleotídeos cada, denominados RNAs pequenos de interferência (siRNA, do inglês *short interfering RNAs*). Por sua vez, os siRNAs se associam a várias proteínas, formando o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, do inglês *RNA-induced silencing complex*), que direciona os siRNAs para a sequência de RNA mensageiro-alvo. Em seguida, a dupla-fita de siRNA se desenrola, permitindo que uma das fitas (a fita *antisense* ou “fita guia”) se anele ao RNA mensageiro-alvo de

sequência complementar à da fita guia, sinalizando sua degradação endonucleolítica por enzimas pertencentes ao núcleo catalítico do RISC (DYKXHOORN et al. 2003).

Ao contrário de plantas, fungos e vermes, não há indícios até o momento da replicação de siRNA em mamíferos, apesar da existência de toda a maquinaria enzimática intracelular necessária para o funcionamento do mecanismo de interferência de RNA (CASTANOTTO e ROSSI 2009). A introdução exógena de siRNAs para o interior das células pode ser feita de vários modos distintos e vem sendo amplamente empregada para silenciar genes de interesse e analisar as alterações celulares decorrentes, com o intuito de estudar sua função biológica e sua participação em vias de sinalização.

Uma vez que não foram encontradas sequências previamente testadas e validadas para o silenciamento de cada uma das isoformas de ADAM23 disponíveis por empresas fornecedoras desta tecnologia ou em trabalhos da literatura, decidimos desenhar manualmente nossa própria sequência. No primeiro momento, optamos por construir duas sequências para cada isoforma e utilizar duplexes sintéticos dupla-fita de RNA, que exercem efeito de silenciamento transiente sobre a expressão do transcrito de interesse, para selecionar a mais eficiente entre elas de modo rápido.

Para o desenho dos duplexes, adotamos alguns parâmetros descritos na literatura que são comuns às sequências dos melhores RNAs e que, por isso, discriminam aqueles com maior possibilidade de produzirem efeito de silenciamento satisfatório (DYKXHOORN et al. 2003; KIM et al. 2005; PEI e TUSCHL 2006; PATZEL 2007) (Figura 3):

- seleção de sequências complementares a regiões não-repetitivas do DNA;

- seleção de sequências com conteúdo de bases C+G próximo a 50% (30-70%);
- evitar sequências que possuam pares de CG alternados ou mais de 3 Gs em seguida;
- seleção preferencial de duplexes cuja fita *antisense* do RNAi (ou fita guia) possua as extremidade 5' e 3' com maior e menor conteúdo de bases A+U, respectivamente, de modo a conferir-lhes menor e maior estabilidade termodinâmica;
- desenho de duplexes assimétricos, isto é, a fita guia deve ter dois nucleotídeos a mais na extremidade 3' do que a fita *sense*, o que facilita seu processamento pela endonuclease Dicer;
- modificação dos dois últimos nucleotídeos da fita *sense* para bases de DNA ao invés de RNA, o que também aumenta sua eficiência de clivagem pela Dicer;
- adição de um grupo fosfato na extremidade 5' da fita *sense*, o que facilita sua incorporação no RISC e favorece a degradação do transcrito-alvo do RNAi.

Além destes parâmetros, durante o desenho dos duplexes também utilizamos algumas ferramentas computacionais capazes de selecionar RNAs específicos e eficientes para o gene de interesse com grande sucesso, como *IDT RNAi design*¹, *siRNA Finder*² e *siRNA Selection Server*³.

Ferramentas *in silico* disponíveis em:

¹ **IDT RNAi design** <<http://idtdna.com/Scitools/Applications/RNAi/RNAi.aspx>>

² **siRNA Finder** <http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html>

³ **siRNA Selection Server** <<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNA>>

Uma vez escolhidas as melhores sequências para silenciar cada uma das isoformas, estas foram avaliadas *in silico* quanto à especificidade de alinhamento ao transcrito-alvo utilizando-se os programas BLASTn (ALTSCHUL et al. 1990) e BLAT (KENT 2002). Por fim, dois duplexes de 27pb selecionados para cada isoforma foram sintetizados pela empresa IDT (*Integrated DNA Technology, Inc.*).

Os duplexes selecionados para silenciar individualmente cada isoforma do gene ADAM23 e seu local de alinhamento no RNA mensageiro já processado correspondente estão demonstradas na figura 3.

Figura 3 – Interferência de RNA (RNAi) para as isoformas α , β e γ do gene ADAM23. **A** – Representação esquemática da estrutura padrão de um duplex para RNAi, ressaltando as características que conferem-lhe uma maior chance de atingir efeito de silenciamento gênico satisfatório. **B** – Sequência dos duplexes sintéticos de RNAi para as isoformas α , β e γ do gene ADAM23. Estão demonstradas as sequências dos dois RNAs construídos para cada uma das isoformas, bem como seu local de alinhamento no RNA mensageiro maduro da isoforma correspondente. Em verde claro está representado o exon 24, que codifica para o domínio EGF-like, comum às três isoformas; em cor-de-laranja e amarelo estão representados os exons 26 e 25, que codificam para os domínios transmembranas das isoformas α e β respectivamente; e em verde escuro está representado o exon 27, que codifica para os domínios citoplasmáticos de cada isoforma.

3.9 Transfecção da linhagem tumoral MDA-MB-435 com os duplexes sintéticos para interferência de RNA

As transfecções dos duplexes sintéticos na linhagem MDA-MB-435 foram realizadas utilizando-se o kit *Lipofectamine RNAi Max* (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Basicamente, 1×10^4 células/cm² foram plaqueadas em 2ml de meio RPMI sem antibiótico suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB), 24 horas antes da transfecção. No dia da transfecção, diferentes concentrações dos duplexes de RNAi (1, 10, 20 e 50nM) foram incubadas com 5µl de *Lipofectamine RNAi Max* em 0.5ml de meio Opti-MEM[®] durante 20 minutos a temperatura ambiente, para permitir a formação dos complexos RNAi-lipossomos. Em seguida, os complexos foram adicionados gentilmente sobre as células lavadas e mantidas em meio RPMI sem antibiótico suplementado com 10% de SFB. As placas contendo as células transfectadas foram armazenadas em estufa a 37°C em uma atmosfera úmida com 5% CO₂/95% ar durante todo o experimento e o meio de cultura das células foi trocado diariamente, 24, 48, 72 (...) horas após a transfecção. Este experimento foi realizado duas vezes, em dias distintos.

3.10 Construções de shRNA para interferência de RNA

A estratégia empregada para silenciar estavelmente a expressão gênica de cada isoforma do gene ADAM23 foi o uso de vetores plasmidiais contendo um pequeno inserto de DNA (aproximadamente 64-80 nucleotídeos) o qual, ao ser transcrito no interior das células, produz uma molécula de RNA capaz de se dobrar e formar um pequeno grampo de RNA dupla fita (shRNA, do inglês *short hairpin RNA*).

Este shRNA é, então, clivado pela enzima Dicer e convertido em siRNAs *in vivo*, os quais são direcionados para a maquinaria de RNAi intracelular e são capazes de sinalizar a degradação do RNA mensageiro-alvo, inibindo sua expressão (DYKXHOORN et al. 2003). Vetores plasmidiais contendo o shRNA podem ser transfectados para o interior das células e, utilizando um agente de seleção, é possível obter linhagens celulares homogêneas estavelmente silenciadas.

Neste trabalho, utilizamos o plasmídeo pAVU6+27 (PAUL et al. 2002), gentilmente cedido pelo Dr. Paul D. Good, do laboratório do Dr. David R. Engelke, da Universidade de Michigan (EUA), que já havia sido utilizado em nosso laboratório previamente, com grande sucesso para o silenciamento do gene de interesse (VERBISCK et al. 2009) (Figura 4).

Figura 4 – Mapa do vetor plasmidial pAVU6+27. Este vetor contém o promotor para a proteína humana U6 do spliceossomo (*destacado em azul*), que é reconhecido pela enzima RNA polimerase III, acrescido de 27 nucleotídeos iniciais do RNA nuclear pequeno U6 humano (*destacado em verde*). Este plasmídeo também possui origem de replicação bacteriana e os genes de resistência aos

antibióticos ampicilina e neomicina (*região marcada em vermelho*), que permitem a seleção bacteriana e de células humanas, respectivamente. A clonagem direcionada dos fragmentos contendo as seqüências formadoras dos shRNAs é feita entre os sítios únicos das enzimas de restrição *Sal I* e *Xba I* (*destacados em vermelho*).

Os fragmentos clonados no vetor plasmidial para formação do shRNA foram construídos a partir das seqüências dos duplexes de RNAi selecionadas anteriormente para cada isoforma do gene ADAM23 (RNAi $\alpha 1$, $\beta 2$ e $\gamma 1$, página 103, item 4.3 de *Resultados*). Em cada construção, foram adicionadas algumas regiões importantes para a correta formação do shRNA (Figura 5):

- sítio para ligação direcionada no vetor;
- região espaçadora, importante para o correto dobramento da molécula de RNA e o perfeito anelamento das seqüências *sense* e *antisense*, que formam a “haste” do grampo;
- seqüência *sense* do siRNA (idêntica à do mRNA-alvo, sentido 5'- 3');
- região do grampo;
- seqüência *antisense* do siRNA (complementar ao mRNA-alvo, sentido 3'- 5');
- região de terminação do transcrito.

Em todas as construções de shRNA, utilizamos uma seqüência de nove nucleotídeos na região do grampo (5' TTCAAGAGA 3'), importante para que a molécula de RNA se dobre corretamente e forme a estrutura do grampo, que confere maior eficiência ao siRNA, conforme previamente demonstrado por BRUMMELKAMP et al. (2002).

A representação esquemática das construções de shRNA para as isoformas α , β e γ do gene ADAM23 clonadas no vetor plasmidial pAVU6+27 pode ser visualizada na figura 5.

Figura 5 – Construções de shRNA para as isoformas α , β e γ do gene ADAM23. Estão representados os oligonucleotídeos complementares *forward* e *reverse* (80 nucleotídeos cada), na orientação de 5' para 3', que foram anelados e inseridos no vetor pAVU6+27. Em cada construção, estão demonstradas as sequências contendo as extremidades protrusivas para ligação direcionada no vetor (*vermelho*), as regiões espaçadoras (*azul*) e as sequências específicas *sense* e *antisense* dos siRNAs (27 nucleotídeos cada, *em preto*), separadas pela região do grampo (9 nucleotídeos, *em verde*). A repetição de timidinas, importante para a terminação da transcrição, está sublinhada. Na parte inferior da figura está exemplificado um pequeno RNA dupla fita em forma de grampo (*shRNA*), formado após a transcrição do inserto de DNA, como aqueles representados acima, e que, ao ser processado, produz os *siRNAs*, capazes de sinalizar o mRNA-alvo para degradação pela maquinaria de RNAi intracelular.

3.11 Clonagem das construções de shRNA

Os oligonucleotídeos construídos para formar os shRNAs foram sintetizados pela empresa IDT (*Integrated DNA Technology, Inc.*) e ressuspendidos em água Milli Q autoclavada, a fim de se obter uma concentração final de 3µg/µl. Previamente à ligação no vetor plasmidial, os pares de oligonucleotídeos *forward* e *reverse* para silenciamento do transcrito de cada isoforma foram anelados para formar os fragmentos de DNA dupla fita. Para o anelamento, 1µl de oligonucleotídeo *forward* e 1µl de oligonucleotídeo *reverse* foram adicionados a 48µl de solução tampão HEPES/Acetato de Potássio (100mM Acetato de Potássio, 2mM Acetato de Magnésio, 30mM HEPES-Hidróxido de Potássio, pH 7.4), e esta mistura foi incubada a 95°C durante 4 minutos, a 70°C por 10 minutos, a 25°C por 15 minutos e a 4°C por 15 minutos, para seu resfriamento lento. O correto anelamento dos oligonucleotídeos foi confirmado por eletroforese em gel de agarose 12%.

Em seguida, os oligonucleotídeos anelados em dupla fita foram fosforilados. Para tanto, 2µl dos oligonucleotídeos anelados foram incubados a 37°C durante 30 minutos na presença de 10U da enzima T4 polinucleotídeo quinase (*New England Biolabs*) e 1mM de ATP (presente em 1X tampão da enzima T4 DNA Ligase, *New England Biolabs*), em uma reação com volume final de 10µl, seguindo-se a inativação da enzima a 70°C por 10 minutos.

Os fragmentos de DNA dupla fita fosforilados (2µl) foram ligados ao vetor pAVU6+27 (100ng), previamente linearizado por dupla digestão com as enzimas de restrição *Sal*I e *Xba*I (*Promega*, tampão D), através de incubação durante 14 horas a 14°C, em presença da enzima T4 DNA Ligase (*New England Biolabs*).

Os produtos de ligação foram dialisados contra água Milli Q durante 30 minutos em membrana de nitrocelulose (*Millipore*) e, em seguida, 2µl do produto dialisado foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* (DH10B) eletrocompetentes (SAMBROOK e RUSSEL 2001), as quais foram selecionadas em placas contendo 40µg/ml X-gal, 24µg/ml IPTG e 100µg/mL ampicilina. No dia seguinte, a presença dos plasmídeos recombinantes foi verificada em cinco clones bacterianos de cada construção através da extração do DNA plasmidial e sua digestão com a enzima de restrição *Hind* III (*New England Biolabs*, tampão 2), uma vez que este plasmídeo apresenta dois sítios de restrição para esta enzima que permeiam o sítio de clonagem (Figura 4). Os produtos de digestão foram analisados por eletroforese e uma colônia contendo cada um dos fragmentos de interesse foi inoculada em 2ml de meio de cultura Circle Grow (*Bio 101, Inc.*) contendo 100µg/ml ampicilina e deixadas em shaker a 37°C *overnight*. No dia seguinte, após a obtenção do pellet celular, realizou-se a extração de DNA plasmidial, utilizando-se o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (*Promega*), seguindo as especificações do fornecedor. Os produtos da extração foram analisados por eletroforese e quantificados em espectrofotômetro, seguindo-se o sequenciamento para confirmação da sequência correta nos fragmentos clonados. O sequenciamento foi realizado segundo a técnica de terminação com dideoxynucleotídeos descrita por SANGER et al. (1977), utilizando-se o kit *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing* (*Amersham Biosciences*), seguindo as instruções do fornecedor. Os produtos do sequenciamento foram submetidos a eletroforese por capilaridade no sequenciador automático de DNA *ABI 3100* (*Applied Biosystems*).

3.12 Transfecção da linhagem tumoral MDA-MB-435 com os plasmídeos recombinantes contendo shRNAs isoforma-específicos

Uma vez confirmada a presença da sequência correta nos fragmentos clonados no vetor pAVU6+27, os plasmídeos recombinantes foram transfectados na linhagem tumoral MDA-MB-435, utilizando o reagente de transfecção FuGENE[®] (*Roche*). Basicamente, 2×10^4 células/cm² foram plaqueadas em meio RPMI sem antibiótico suplementado com 10% SFB, 24 horas antes da transfecção. No dia da transfecção, 1µg de DNA plasmidial foi incubado com 3µl ou 6µl de FuGENE[®] (*Roche*) em 100µl de meio RPMI puro sem antibiótico, durante 30 minutos, a temperatura ambiente, para permitir a formação dos complexos DNA-lipossomos. Em seguida, os complexos foram adicionados gentilmente sobre as células lavadas e mantidas em meio RPMI sem antibiótico suplementado com 10% SFB. As placas contendo as células transfectadas foram armazenadas em estufa a 37°C em uma atmosfera úmida com 5% CO₂ e 95% de ar. 24 horas após a transfecção, o meio de cultura das células foi trocado por meio RPMI com antibiótico suplementado com 10% SFB. As células que receberam o plasmídeo recombinante foram selecionadas a partir de 48 horas após a transfecção do vetor plasmidial, utilizando 1mg/ml do antibiótico G-418 (*Sigma*), durante 10 dias. Após o período de seleção, as células derivadas das linhagens MDA-MB-435 selecionadas foram expandidas e uma amostra de cada população transfectada foi removida para avaliar o impacto dos shRNAs na expressão das isoformas de ADAM23.

3.13 Isolamento de clones das populações derivadas da linhagem MDA-MB-435 expressando estavelmente shRNA α , β ou γ

As populações derivadas da linhagem tumoral MDA-MB-435 expressando estavelmente shRNA α , β ou γ ou o vetor pAVU6+27 vazio foram submetidas à diluição limitante para isolamento de clones da seguinte maneira:

Trinta células foram ressuspensas em 10ml de meio RPMI contendo 10% SFB, e 100 μ l desta solução foram adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços. Desta maneira, era esperado que a cada três poços, um deles contivesse uma única célula.

Cada poço foi observado e somente os poços que continham uma única célula foram marcados e mantidos em incubação durante duas semanas para crescimento dos clones. Os clones foram transferidos para placa de 48 poços, 24 poços e finalmente para garrafas de 25 cm².

Os clones isolados foram coletados para extração de RNA e síntese de cDNA para a confirmação da redução nos níveis de expressão de cada isoforma do gene ADAM23 através de reações de amplificação em tempo real, conforme descrito nos itens 3.3 a 3.7 de *Material e Métodos*.

3.14 Curva de proliferação em cultura bidimensional

No experimento de proliferação em cultura bidimensional (monocamada), células MDA-MB-435 WT e seus derivados celulares foram tripsinizados, quantificados em câmara de Neubauer e ressuspensas em meio RPMI contendo 10% SFB. Para cada tipo celular, foram feitas simultaneamente sete placas idênticas

de 10cm² de superfície, sendo que em cada placa foram adicionadas aproximadamente 50 mil células. As células foram incubadas em estufa a 37°C durante um a oito dias. A cada dia, uma das placas de cada tipo celular foi removida da estufa, de modo aleatório. As placas foram lavadas com PBS para a remoção das células mortas, e as células saudáveis foram tripsinizadas e quantificadas em câmara de Neubauer, pelo método de exclusão com *Trypan Blue*, que facilita a identificação das células não-viáveis. Este experimento foi realizado três vezes, em dias distintos.

3.15 Produção de esferóides multicelulares *in vitro*

Para a formação de esferóides multicelulares *in vitro*, 40000 células da linhagem MDA-MB-435 e de seus derivados celulares em estudo foram ressuspensas em 300µl de meio RPMI contendo 10% SFB e plaqueadas em cada poço de placas de 48 poços contendo uma cama de agarose 1% em RPMI sem soro, para impedir a adesão das células no fundo do poço e facilitar a agregação espontânea das células. As placas foram incubadas em estufa a 37°C, em uma atmosfera úmida com 5% CO₂ e 95% de ar durante quatro dias, para permitir a agregação espontânea das células e a formação dos esferóides.

3.16 Ensaio de incorporação de BrdU em células cultivadas em 3-D

A taxa de incorporação de BrdU das células MDA-MB-435 e de seus derivados celulares cultivados em modelo tridimensional *in vitro* foi avaliada empregando-se esferóides multicelulares previamente preparados e incubados

durante quatro dias em estufa a 37°C. Para tanto, adicionou-se a solução de BrdU (0.1mg/ml bromodeoxiuridina, em RPMI, *Sigma-Aldrich*) diretamente sobre os esferóides. Após incubação em estufa a 37°C durante seis horas, cada esferóide foi removido da placa de cultura e transferido para um tubo de 1.5ml contendo 100µl de PBS com EDTA, onde os esferóides foram dissociados. As células isoladas foram ressuspensas em 300µl de meio RPMI com 10% SFB e plaqueadas sobre lamínulas com *coating* prévio de colágeno I humano purificado (10µg/ml, *BD Biosciences*) posicionadas dentro dos poços de uma placa de 24 poços. As células foram incubadas durante três horas em estufa a 37°C para permitir sua adesão nas lamínulas. Após a incubação, o meio de cultura foi removido e as células aderidas nas lamínulas foram fixadas com metanol gelado durante 10 minutos. Seguiu-se a incubação das lamínulas com 1.5N HCl durante 30 minutos e, após lavagem com PBS, foi realizada a marcação com o anticorpo primário anti-BrdU (*Sigma-Aldrich*) diluído 100 vezes em PBS com 5% SFB durante 60 minutos, a temperatura ambiente, e o anticorpo secundário anti-mouse conjugado ao fluoróforo Alexa-488 (*Molecular Probes*) diluído 500 vezes em PBS com 5% SFB, por 30 minutos, a 4°C, no escuro. Após lavagem com PBS, as lamínulas foram incubadas com DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol, *Sigma-Aldrich*) em PBS, durante cinco minutos, para marcação dos núcleos celulares. Por fim, após a montagem das lamínulas nas lâminas, o resultado foi analisado em microscópio de fluorescência acoplado a uma câmera DP-70 (*Olympus BX61*), utilizando o programa computacional *BX2*. Este experimento foi realizado duas vezes, em dias distintos, sendo que, em cada experimento, foram analisados três esferóides de cada um dos tipos celulares em estudo.

3.17 Ensaio de formação de colônias independente de ancoragem

Para avaliar sua capacidade clonogênica, células MDA-MB-435 WT e seus derivados celulares foram tripsinizados, quantificados em câmara de Neubauer e ressuspensas em meio RPMI contendo 10% SFB. Quinhentas células isoladas de cada amostra foram semeadas em agarose 0.3% diluída em RPMI com 10% de soro, e plaqueadas em cada poço de uma placa de 48 poços contendo uma camada de aproximadamente 5mm de agarose 1% em RPMI sem soro. Após incubação durante 30 minutos para solidificação da matriz de agarose, adicionou-se 500µl de meio RPMI com 10% SFB em cada poço. As placas foram incubadas em estufa a 37°C em uma atmosfera úmida com 5% CO₂ e 95% de ar durante 21 dias, para permitir a formação e o crescimento de colônias. O meio de cultura sobre a agarose 0.3% foi trocado a cada sete dias.

Após o período de incubação, as colônias formadas em cada amostra foram fotografadas utilizando um microscópio acoplado a uma câmera DP-70 (*Olympus BX61*). A quantificação do número de colônias formadas foi realizada utilizando o programa computacional *Image J* (*National Institutes of Health, EUA*). Este experimento foi repetido três vezes, sendo que, em cada experimento, cada tipo celular foi analisado em duplicata.

3.18 Ensaio de adesão em condições padrão de cultivo *in vitro*

Os experimentos que avaliaram a capacidade de adesão das células MDA-MB-435 WT e de seus derivados celulares em condições padrão de cultivo foram realizados em placas de 96 poços, não-sensibilizadas previamente com nenhum

substrato. Para tanto, as células foram removidas das placas de cultura utilizando solução de tripsina, quantificadas em câmara de Neubauer e ressuspensas em meio RPMI com 10% SFB. Foram plaqueadas aproximadamente 50 mil células em cada poço, em quadruplicata, e as placas foram incubadas em estufa a 37°C durante duas horas. Após o período de incubação, as placas foram removidas da estufa e cada um de seus poços foi lavado com PBS para a remoção das células não-aderidas. Em seguida, as células aderidas foram fixadas com solução 3.7% formaldeído em PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente e coradas com solução 0.1% cristal violeta, 2% etanol. A quantificação das células aderidas foi realizada em espectrofotômetro a 595nm, após a solubilização das células em solução 2% SDS. Este experimento foi realizado três vezes, em dias distintos.

3.19 Ensaio de adesão em vitronectina e fibronectina *in vitro*

Os ensaios de adesão celular foram realizados em placas de 96 poços, previamente preparadas com a proteína de interesse. Inicialmente, foi feito o *coating* da placa utilizando vitronectina humana purificada (1.25µg/ml, V8379, *Sigma-Aldrich*) ou fibronectina humana purificada (2.5µg/ml, F1056, *Sigma-Aldrich*) diluída em meio RPMI sem soro. As placas foram incubadas a 4°C durante a noite. No dia seguinte, removeu-se o meio de cada um dos poços e foi feito o bloqueio com solução 2.5% albumina sérica bovina (BSA) em PBS, a 4°C, durante a noite.

No dia do ensaio, as células MDA-MB-435 WT e seus derivados celulares foram removidos das placas de cultura utilizando PBS, quantificadas em câmara de Neubauer e ressuspensas em meio RPMI sem soro. Foram plaqueadas aproximadamente 50 mil células em cada poço, em duplicata. Para o controle

positivo, a mesma quantidade de células foi plaqueada em poços em que não foram feitos o *coating* nem o bloqueio e, neste caso, adicionou-se soro fetal bovino (concentração final = 10%). As células foram incubadas em estufa a 37°C durante duas horas. Após a incubação, cada poço da placa foi lavado com PBS para a remoção das células não-aderidas, seguindo-se a fixação das células aderidas com solução 3.7% formaldeído em PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente e a coloração com solução 0.1% cristal violeta, 2% etanol. A quantificação das células aderidas foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm, após a solubilização das células em solução 2% SDS.

Na análise dos resultados, a quantidade de células aderidas no controle negativo (poços em que foi feito apenas o bloqueio com solução 2.5% BSA e não o *coating*) foi considerada inespecífica e, por isso, foi subtraída da quantidade de células aderidas em todas as outras amostras.

Este experimento foi realizado três vezes com cada substrato, em dias distintos.

3.20 Ensaio de espraio celular (*spreading*) *in vitro*

Os ensaios de espraio celular foram realizados em placas de 24 poços, previamente preparadas com a proteína de interesse. Inicialmente, foi feito o *coating* da placa utilizando fibronectina humana purificada (10µg/ml, F1056, *Sigma-Aldrich*), colágeno I humano purificado (10µg/ml, *BD Biosciences*) ou matrigel (500µg/ml, *BD Biosciences*), diluídos em meio RPMI sem soro. As placas foram incubadas a 4°C durante a noite. No dia seguinte, removeu-se o meio de cada um dos poços e foi feito o bloqueio com solução 2.5% BSA em PBS, a 4°C, durante a noite.

Além de componentes da matriz extracelular, a capacidade de espraçamento das células também foi avaliada em condições padrão de cultivo, em que as células foram plaqueadas em placas de 24 poços previamente incubadas com meio RPMI contendo 10% SFB a 4°C, durante a noite, porém não-sensibilizadas com nenhum substrato de matriz extracelular.

Para avaliar o espraçamento celular, as células MDA-MB-435 WT e seus derivados celulares foram removidos das placas de cultura utilizando PBS, quantificadas em câmara de Neubauer e ressuspensas em meio RPMI contendo 10% SFB. Aproximadamente 150 mil células foram plaqueadas em cada poço de uma placa de 24 poços, em duplicata. As células foram incubadas em estufa a 37°C durante cinco horas. Após a incubação, o fenótipo celular foi observado e documentado utilizando um microscópio acoplado a uma câmera DP-70 (*Olympus BX61*). A área das células foi analisada utilizando o programa computacional *Image J* (*National Institutes of Health, EUA*). Na análise dos resultados, está demonstrada a área média de 100 células, para cada amostra avaliada.

3.21 Ensaio de morfologia celular

Para avaliar a morfologia das células MDA-MB-435 e de seus derivados celulares, foi realizado um experimento semelhante ao ensaio de espraçamento celular (*spreading*) *in vitro* descrito no item anterior, modificando-se apenas o tempo de incubação das células. Neste caso, após serem semeadas em placas de cultura previamente tratadas com fibronectina humana purificada (10µg/ml, F1056, *Sigma-Aldrich*), colágeno I humano purificado (10µg/ml, *BD Biosciences*) ou matrigel (500µg/ml, *BD Biosciences*), diluídos em meio RPMI sem soro, ou em placas não-

sensibilizadas com nenhum substrato e tratadas com meio de cultura contendo 10% SFB, as células foram incubadas em estufa a 37°C durante 28 horas.

Os demais parâmetros do ensaio foram conduzidos de modo idêntico ao ensaio de espreadimento, inclusive a análise dos resultados.

3.22 Análise estatística

Os resultados dos ensaios funcionais realizados com a linhagem parental MDA-MB-435 e seus derivados celulares com redução da expressão das isoformas α , β ou γ do gene ADAM23, ou expressando o vetor pAVU6+27 vazio, foram analisados empregando o programa computacional *GraphPad Prism 5.0*. Em todos os experimentos, a existência de diferença entre os tipos celulares em estudo foi avaliada pelo teste estatístico *One-way ANOVA*, seguido pelo pós-teste de Tukey. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados em que $p < 0.05$ para os dois clones com diminuição da expressão da mesma isoforma, exceto para os derivados clonais com silenciamento completo do gene ADAM23, em que foi utilizado apenas um clone (A23neg).

4 RESULTADOS

4.1 Padronização de um ensaio para avaliar a expressão diferencial das isoformas de splicing do gene ADAM23

Em nosso estudo, a expressão das isoformas de splicing α , β e γ do gene ADAM23 foi avaliada em diferentes linhagens celulares tumorais e tecidos normais através de reações de amplificação em tempo real. Para tanto, desenhamos iniciadores capazes de amplificar especificamente cada uma das variantes. Foram desenhados e avaliados um iniciador *forward* e dois iniciadores *reverse* para cada uma das isoformas, como esquematizado na figura 6. Os iniciadores *forward* foram posicionados na junção dos exons codificados diferencialmente por cada isoforma e os iniciadores *reverse* foram posicionados no exon exclusivo de cada transcrito ou no exon que codifica o domínio citoplasmático, comum às três variantes.

Cada um dos dois conjuntos de iniciadores de cada isoforma foi testado em três concentrações diferentes (100, 200 e 400nM), utilizando como molde das reações cDNA da linhagem MDA-MB-435, que expressa altos níveis do gene ADAM23. Consideramos como o melhor par de iniciadores aquele que apresentou melhor eficiência de amplificação e maior especificidade, esta última avaliada através da curva de dissociação dos produtos amplificados e por meio de eletroforese em géis de poliacrilamida. Escolhemos a concentração de 400nM de iniciadores para as reações das três isoformas.

Figura 6 – RNA mensageiro primário do gene ADAM23 humano, destacando-se sua extremidade 3', o processo de splicing alternativo para as isoformas α , β e γ , e a localização dos iniciadores utilizados para amplificar cada isoforma. **A** – Estrutura do gene ADAM23, ressaltando os exons que codificam os domínios *EGF-like*, transmembrana e citoplasmático, localizados na extremidade 3' do gene e envolvidos no processo de splicing. **B** – Representação esquemática da extremidade 3' do gene, demonstrando o tamanho dos introns entre os exons e a localização dos iniciadores *forward* (F) e *reverse* (R) utilizados nas reações de amplificação de cada uma das isoformas.

Além das reações de amplificação das isoformas de splicing do gene ADAM23, também padronizamos as reações de amplificação dos genes HMBS e PUM1, utilizados como genes normalizadores nas reações de PCR em tempo real por apresentarem expressão estável entre as amostras analisadas e nível de expressão semelhante ao das isoformas de splicing do gene ADAM23. A estabilidade da expressão dos genes HMBS e PUM1 nas diferentes amostras foi analisada com o auxílio do programa *geNorm* (VANDESOMPELE et al. 2002).

Após a padronização das reações de amplificação, calculamos a eficiência de amplificação de cada par de iniciadores a partir de uma curva construída com diluições seriadas de cDNA. Na figura 7 estão demonstradas as curvas de dissociação dos produtos amplificados e as curvas utilizadas para o cálculo da eficiência de amplificação de cada um dos pares de iniciadores utilizados nas reações de amplificação.

Figura 7 - Reações de amplificação em tempo real para as isoformas α (**A**), β (**B**) e γ (**C**) do gene ADAM23 e para os genes endógenos HMBS (**D**) e PUM1 (**E**). Na coluna à esquerda, estão

representadas as curvas de dissociação dos produtos amplificados na reação de cada uma das isoformas do gene ADAM23 e dos normalizadores HMBS e PUM1. Na coluna à direita, estão demonstradas as curvas utilizadas para o cálculo da eficiência de amplificação de cada um dos pares de iniciadores utilizados nas reações de amplificação, a partir da correlação entre o ciclo de amplificação de cada ponto (C_T , local em que cada curva ultrapassa o limiar) e a quantidade de cDNA molde utilizada. Os valores de eficiência calculados [$E = 10^{(-1/\text{slope})}$] para cada par de iniciadores estão indicados à direita dos gráficos.

Para eliminar a possibilidade de amplificação cruzada entre as diferentes isoformas de splicing do gene ADAM23, realizamos reações de amplificação utilizando os iniciadores específicos para cada uma das isoformas e fragmentos purificados das outras duas isoformas em diferentes concentrações como molde da reação de amplificação. Por exemplo, para avaliar a especificidade dos iniciadores que amplificam a isoforma ADAM23 α , utilizamos fragmentos das isoformas β e γ . Constatamos que os três pares de iniciadores não apresentam amplificação cruzada entre as isoformas, mesmo quando utilizamos um excesso (10^6 cópias) de DNA molde nas reações (dados não apresentados).

4.2 Avaliação da expressão diferencial das isoformas de splicing do gene ADAM23 em tecidos normais e linhagens tumorais

A análise do perfil de expressão de um gene em diferentes amostras biológicas pode auxiliar a desvendar sua função, pois fornece pistas dos processos em que este gene pode participar, através da correlação entre seus níveis de expressão e as características das amostras avaliadas.

Tendo isto em vista, um dos objetivos principais deste estudo foi avaliar o perfil de expressão das isoformas de splicing α , β e γ do gene ADAM23 em diferentes tecidos normais e linhagens celulares tumorais, a fim de verificar a existência de expressão diferencial entre elas.

Para tanto, empregamos o método de quantificação absoluta. Nesta estratégia, o número de cópias do transcrito de interesse é determinado na amostra em análise por meio de comparação com uma curva-padrão construída com quantidades conhecidas do transcrito-alvo. A acurácia desta metodologia depende majoritariamente da curva-padrão e, por isso, sua construção é uma etapa extremamente importante.

Para construir a curva-padrão, fragmentos das três variantes do gene ADAM23 e dos controles endógenos HMBS e PUM1 foram amplificados, clonados e sequenciados, a fim de confirmar a sequência correta dos insertos nos plasmídeos. Em seguida, os plasmídeos recombinantes foram utilizados como molde para re-amplificar cada um dos fragmentos. Os produtos re-amplificados foram purificados e quantificados em fluorímetro utilizando um reagente fluorescente capaz de se intercalar exclusivamente em moléculas de DNA dupla-fita, sem que haja interferência de outros tipos de moléculas contaminantes inespecíficas, como, por

exemplo, moléculas de DNA simples fita, moléculas de RNA, proteínas, sais e nucleotídeos livres. Esta técnica permite a quantificação de ácidos nucléicos com altíssima precisão e confiabilidade, muito superior à dos métodos tradicionais, como a leitura da absorbância a 260nm em espectrofotômetro.

Após sua quantificação, os produtos amplificados foram utilizados para a construção da curva-padrão, utilizando quantidades conhecidas e crescentes de moléculas, abrangendo cinco ordens de magnitude (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 moléculas) (Figura 8).

Figura 8 – Curva-padrão para quantificação do número de cópias dos transcritos das isoformas de splicing α (**A**), β (**B**) e γ (**C**) do gene ADAM23 e dos controles endógenos HMBS (**D**) e PUM1 (**E**). Para a construção das curvas foram utilizados produtos de amplificação de cada transcrito diluídos seriadamente em dez vezes, de modo a se obter cinco ordens de magnitude (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 moléculas). O número de cópias de cada ponto da curva, exemplificado na curva de ADAM23 α (**A**), é semelhante nas demais curvas (**B-E**). Para cada reação, estão demonstradas as curvas de amplificação e padrão, onde se observa o ciclo de amplificação de cada ponto (C_T , local em que cada curva ultrapassa o limiar) e a correlação entre os pontos da curva (representados em vermelho), respectivamente.

Podemos observar na figura 8 que, nos diferentes ensaios padronizados, C_T s semelhantes são obtidos para uma mesma quantidade de moléculas (p.ex., C_T s ~21.3 para 10.000 moléculas), o que confirma que números iguais de cópias de cada transcrito foram utilizados em cada ponto da respectiva curva-padrão e que a eficiência de amplificação de cada fragmento é semelhante, o que permite a comparação direta entre o número de cópias das diferentes isoformas e dos genes normalizadores.

Além disso, constatamos que o coeficiente de correlação linear (R^2) entre os pontos utilizados para construir as curvas-padrão foi alto ($R^2 > 0.995$) em todas as reações, assim como a eficiência de cada reação de amplificação (demonstrada pelo *slope* da curva, $E = 10^{(-1/\text{slope})}$), que foi próxima a 100%. Estes resultados confirmam a acurácia desta metodologia para a quantificação absoluta do nível de expressão das diferentes isoformas e normalizadores utilizados no estudo.

Após a padronização das curvas-padrão, passamos à análise dos níveis de expressão das isoformas α , β e γ do gene ADAM23 em doze linhagens tumorais (MDA-MB-435, MDA-MB-436, HCC1599, COLO320DM, COLO320HSR, U87MG, Du145, LNCap, PC3, BxPC-3, HPAC e MIA PaCa-2), derivadas de cinco tecidos diferentes (mama, cólon, cérebro, próstata e pâncreas), que expressavam níveis médios ou altos do gene ADAM23.

Além das linhagens tumorais, também avaliamos a expressão das variantes de ADAM23 em cinco tecidos normais (mama, cólon, cérebro, próstata e pâncreas), para efeito de comparação com as diferentes linhagens tumorais.

Para cada amostra, foram realizadas três sínteses de cDNA e, a partir de cada uma delas, realizamos reações de amplificação para a quantificação do número de cópias de cada isoforma do gene ADAM23 e dos genes endógenos HMBS e PUM1, representando três ensaios independentes. A curva-padrão foi realizada simultaneamente às reações de amplificação nas amostras de interesse todas as vezes em que estas foram conduzidas, a fim de quantificar o número de cópias de cada transcrito, em cada reação. O número final de cópias foi obtido através da média do número de cópias determinado nos três experimentos.

Para eliminar o efeito de variações na quantidade e na qualidade do cDNA nas diferentes amostras, permitindo dessa forma uma análise mais precisa do nível de expressão das três isoformas, o número final de cópias de cada isoforma em uma determinada amostra foi normalizado pela média entre o número de cópias dos genes normalizadores HMBS e PUM1. Foi calculado também o número total de cópias do gene ADAM23 em cada amostra, a partir da somatória do número de cópias final de cada uma das isoformas individualmente (Tabela 2).

Tabela 2 – Quantificação absoluta do número de cópias das isoformas α , β e γ do gene ADAM23 em tecidos normais e em doze linhagens tumorais derivadas de cinco tecidos distintos (mama, cólon, cérebro, próstata e pâncreas). A tabela demonstra a média do número de cópias de cada isoforma obtido em três experimentos independentes para cada amostra, normalizado pela média entre o número de cópias dos genes endógenos HMBS e PUM1, além do número de cópias total do gene ADAM23 (soma do número de cópias final de cada isoforma).

Amostra	ADAM23 α	ADAM23 β	ADAM23 γ	ADAM23 Total
Mama Normal	4	1	72	77
MDA-MB-435	354	30	1229	1613
MDA-MB-436	96	18	681	794
HCC 1599	3	2	60	65
Cólon Normal	29	55	90	173
COLO 320 DM	407	348	2242	2997
COLO 320 HSR	745	360	2867	3973
Cérebro Normal	2224	305	481	3009
U87 MG	663	20	2171	2854
Próstata Normal	39	30	89	158
Du 145	157	59	1127	1342
LNCap	1	0	27	28
PC3	7	1	27	35
Pâncreas Normal	25	25	89	140
BxPC-3	4	1	19	24
HPAC	5	1	48	54
MIA PaCa-2	5	1	16	22

Na figura 9 estão representados os níveis de expressão das isoformas α , β e γ de ADAM23, normalizados pelo nível de expressão dos genes endógenos HMBS e PUM1, nas diferentes amostras analisadas.

A **B**

C

D

E **F**

Figura 9 – Expressão absoluta das isoformas de splicing α , β e γ de ADAM23 em tecidos normais **(A)** e em linhagens tumorais de mama **(B)**, cólon **(C)**, cérebro **(D)**, próstata **(E)** e pâncreas **(F)**. Estão demonstrados no gráfico os valores médios da expressão absoluta de cada isoforma em três experimentos independentes, normalizados pela média entre os valores de expressão absoluta dos genes endógenos HMBS e PUM1.

Inicialmente, observamos que há expressão diferencial entre as isoformas de ADAM23 em todos os tecidos normais (Figura 9A). A isoforma γ é a mais expressa nos tecidos normais avaliados, com exceção do cérebro. Neste tecido, a isoforma α é a mais expressa, e o nível de expressão da isoforma γ é apenas um pouco maior do que o da isoforma β . Em mama e próstata, ADAM23 α é a segunda isoforma mais expressa e ADAM23 β é a menos expressa. Em cólon, a segunda isoforma mais expressa é ADAM23 β , seguida por ADAM23 α . Já em amostra de tecido normal de pâncreas, observamos que, apesar de ADAM23 γ ser a isoforma mais abundante, as isoformas α e β são expressas em níveis semelhantes.

Em seguida, avaliamos se o padrão de expressão diferencial das isoformas observado nos tecidos normais se mantinha nas linhagens tumorais. Em mama e próstata, observamos que o padrão de expressão das isoformas de ADAM23 observado em tecido normal é mantido nas linhagens tumorais analisadas (Figuras 9B e 9E). Em todas essas amostras, a isoforma γ é a mais expressa, seguida das isoformas α e β .

Alterações no padrão de expressão diferencial das isoformas foram observadas nas comparações entre tecido normal e linhagens tumorais de cólon, cérebro e pâncreas. Na figura 9C podemos observar que, em tecido normal de cólon, ADAM23 γ é a isoforma mais expressa, seguida por ADAM23 β , sendo a

isoforma α a menos expressa. Nas duas linhagens tumorais de cólon avaliadas, os níveis de expressão da isoforma γ aumentaram significativamente e esta isoforma se manteve como a mais expressa. ADAM23 α e β também apresentaram um grande aumento em seus níveis de expressão nas linhagens tumorais, sendo que a isoforma α tornou-se mais expressa do que a isoforma β .

Em cérebro, constatamos que os níveis de expressão da isoforma α , que eram os mais altos no tecido normal, sofreram uma significativa redução na linhagem tumoral avaliada, enquanto a expressão de ADAM23 γ aumentou consideravelmente na linhagem tumoral, de modo que esta isoforma passou a ser a mais expressa. A isoforma β foi a menos expressa em tecido normal de cérebro e também na linhagem tumoral (Figura 9D).

Em pâncreas, constatamos que a isoforma γ foi a mais abundante no tecido normal e nas três linhagens tumorais avaliadas (Figura 9F). Entretanto, enquanto no tecido normal as isoformas α e β apresentaram níveis de expressão semelhantes, em todas as linhagens tumorais estudadas observamos uma maior expressão de ADAM23 α , em relação a ADAM23 β . Por fim, observamos que as três isoformas de ADAM23 são mais expressas no tecido normal de pâncreas do que nas linhagens tumorais avaliadas.

Em seguida, avaliamos se a proporção em que cada isoforma é expressa, em relação ao nível total de expressão do gene ADAM23, sofria modificações nas linhagens tumorais, em relação aos tecidos normais correspondentes. Nesta análise, também observamos diferenças significativas entre os diferentes tecidos normais e as respectivas linhagens tumorais (Figura 10).

A

B

Figura 10 – Expressão relativa das isoformas de splicing α , β e γ de ADAM23 em tecidos normais (**A**) e em linhagens tumorais de mama, cólon, cérebro, próstata e pâncreas (**B**), em comparação à expressão total do gene ADAM23. Estão demonstrados no gráfico os valores médios do número de cópias absoluto de cada isoforma em três experimentos independentes, relativos ao número total de cópias do gene ADAM23 (somatória do número de cópias final de cada isoforma individualmente).

A figura 10A nos mostra que, apesar da isoforma γ ser a mais abundante em todos os tecidos normais (exceto por cérebro), sua expressão corresponde a frações variáveis do total de transcritos do gene ADAM23. Por exemplo, em tecido normal de mama a quantidade de transcritos de ADAM23 γ corresponde a mais de 90% do total de transcritos de ADAM23; já em tecido normal de cólon, próstata ou pâncreas, ela corresponde a pouco mais de 50% da expressão total, sendo que em cérebro, não atinge 20%.

Em relação à isoforma α , observamos que, enquanto em cérebro normal seu nível de expressão corresponde a cerca de 70% de todos os transcritos do gene ADAM23, em tecido normal de cólon, próstata e pâncreas, ele corresponde a 16%, 24% e 18% respectivamente, e representam apenas 5% de todos os transcritos de ADAM23 em mama normal (Figura 10A).

Considerando a isoforma β , sua expressão relativa a ADAM23 total é maior em tecido normal de cólon (31%), seguida por próstata e pâncreas (18%). Em cérebro normal, apenas 10% de todos os transcritos de ADAM23 correspondem à isoforma β , enquanto em mama normal, estes não ultrapassam 1% do total (Figura 10A).

Ao avaliarmos as linhagens tumorais, observamos que a fração que os transcritos de cada isoforma do gene ADAM23 representam em relação ao número

total de transcritos deste gene, também se altera nas linhagens tumorais, quando comparamos com os respectivos tecidos normais (Figura 10B).

Em mama, é possível constatar que a proporção de transcritos γ em relação a ADAM23 total diminuiu nas linhagens tumorais MDA-MB-435 e MDA-MB-436, enquanto a proporção de transcritos ADAM23 α aumentou significativamente nestas linhagens ($p < 0.01$) (Figura 10B). A fração que a expressão da isoforma β representa se manteve praticamente inalterada nestas duas linhagens tumorais, quando comparadas ao tecido normal de mama. No entanto, na linhagem tumoral HCC1599, o nível absoluto de expressão e as frações de expressão de cada uma das isoformas de ADAM23 são muito semelhantes ao observado no tecido normal de mama.

Em cólon, observamos que a proporção em que a isoforma γ é expressa, em relação ao nível de expressão total do gene ADAM23, aumentou significativamente nas duas linhagens tumorais avaliadas, quando comparadas ao tecido normal ($p < 0.001$) (Figura 10B). Neste tecido, a fração representada pela isoforma α não sofreu alterações significativas entre o tecido normal e as linhagens tumorais. No caso da isoforma β , a fração que seu número de transcritos representa em relação ao número total de transcritos do gene ADAM23 diminuiu significativamente nas duas linhagens tumorais de cólon, em relação ao tecido normal ($p < 0.001$) (Figura 10B).

Em cérebro, a alteração da proporção entre a expressão de cada isoforma e os níveis totais do gene ADAM23 observada na linhagem tumoral, em relação ao tecido normal, foi a mais significativa dentre os cinco tecidos avaliados (Figura 10B). Enquanto em cérebro normal, a expressão das isoformas α e γ representavam 73% e 16% do total de transcritos do gene ADAM23, respectivamente, na linhagem

tumoral estudada estas proporções se inverteram, ou seja, a expressão da isoforma γ passou a corresponder a 76% do total e a de ADAM23 α , a apenas 23% ($p<0.001$ para as isoformas α e γ). Em relação a ADAM23 β , cuja expressão representava 10% dos transcritos do gene ADAM23 em cérebro normal, observamos uma considerável redução na fração que seus transcritos representam na linhagem tumoral (1%, $p<0.001$) (Figura 10B).

Em próstata e pâncreas, podemos constatar que houve um aumento na fração que os transcritos de ADAM23 γ representam em todas as linhagens tumorais estudadas, em relação aos tecidos normais (Figura 10B), e este aumento foi estatisticamente significativo ($p<0.001$) em todas as linhagens tumorais de próstata avaliadas e na linhagem de pâncreas HPAC. No caso das linhagens tumorais de próstata, observamos que houve uma redução significativa na proporção dos transcritos das isoformas α e β , em relação ao nível de expressão total do gene ADAM23, quando comparadas ao tecido normal ($p<0.001$, exceto isoforma α em PC3). Já para as linhagens tumorais de pâncreas, observamos que a fração de transcritos do gene ADAM23 representada pela isoforma β diminuiu significativamente nas três linhagens tumorais estudadas ($p<0.05$). Entretanto, para a isoforma α , obtivemos um resultado diferente em cada linhagem tumoral: na linhagem BxPC-3, a fração de transcritos representada por esta isoforma manteve-se igual à do tecido normal, em HPAC houve diminuição, e em MIAPaCa-2, observamos um aumento nesta fração (Figura 10B).

Em resumo, em mama e próstata, apesar de o padrão de expressão das isoformas de ADAM23 observado no tecido normal ter sido mantido nas linhagens tumorais (expressão de ADAM23 γ >ADAM23 α >ADAM23 β), a fração que cada isoforma representa em relação à expressão total do gene ADAM23 variou bastante

entre uma linhagem e outra. Em cólon, cérebro e pâncreas, as linhagens tumorais estudadas apresentaram padrão de expressão das isoformas distinto do tecido normal e a razão relativa a ADAM23 total também foi variável.

Exceto por mama, a fração representada pela expressão da isoforma γ em relação a ADAM23 total aumentou em todas as linhagens tumorais avaliadas, ao compararmos com o respectivo tecido normal, enquanto a fração representada pela isoforma β diminuiu em todas as linhagens tumorais. No caso da fração que os transcritos da isoforma α representam em relação a todos os transcritos de ADAM23, observamos um aumento em algumas linhagens tumorais e diminuição em outras, quando comparadas aos tecidos normais correspondentes. Em mama, obtivemos resultados diferentes em cada uma das três linhagens tumorais estudadas, em relação à fração que cada isoforma representa da expressão total deste gene.

A partir destes resultados, concluímos que há expressão diferencial entre as isoformas α , β e γ de ADAM23 nos cinco tecidos normais avaliados, o que sugere que cada isoforma possua funções biológicas distintas, relacionadas com a fisiologia dos diferentes tecidos. Além disso, observamos que os níveis de expressão das três isoformas de ADAM23 e a fração de expressão que cada isoforma representa na expressão total deste gene estão alterados nas linhagens celulares tumorais, quando comparados aos seus respectivos tecidos normais, sugerindo que cada uma delas exerça papéis distintos na tumorigênese.

4.3 Avaliação do efeito de diferentes duplexes de interferência de RNA no silenciamento específico das isoformas de splicing α , β e γ do gene ADAM23

Até o momento, não existe nenhum relato na literatura acerca do papel biológico das isoformas do gene ADAM23 ou qualquer descrição de seu envolvimento em processos celulares.

Uma vez observado que há expressão diferencial entre as isoformas α , β e γ de ADAM23 em diferentes tecidos normais e em linhagens tumorais, e considerando que ADAM23 está comprovadamente envolvida com a tumorigênese, torna-se extremamente relevante avaliar a função biológica de cada uma de suas isoformas separadamente, de modo a elucidar seu papel individual no surgimento e na progressão tumoral.

A estratégia escolhida para caracterizar funcionalmente as isoformas de splicing α , β e γ do gene ADAM23 foi o silenciamento da expressão de cada isoforma individualmente, através de interferência de RNA (RNAi). Empregando-se esta técnica, é possível silenciar genes de interesse e avaliar as alterações celulares decorrentes de seu silenciamento, o que permite inferir os processos biológicos e/ou vias de sinalização em que este gene está envolvido.

Uma vez que não foram encontradas sequências previamente testadas e validadas para o silenciamento específico de cada uma das isoformas de ADAM23 disponíveis comercialmente ou em trabalhos da literatura, decidimos desenhar manualmente duas sequências para cada isoforma (página 62, item 3.8 de *Material e Métodos*).

Apesar da metodologia de RNAi ser amplamente utilizada atualmente, a escolha da melhor sequência para silenciar um transcrito ainda é feita de modo

empírico, pois os mecanismos moleculares que governam este processo biológico ainda não foram completamente elucidados. Sabe-se que RNAs que possuem como alvo regiões diferentes de um mesmo gene apresentam eficiências de silenciamento significativamente variáveis.

Por este motivo, optamos por utilizar inicialmente duplexes sintéticos de RNAi, a fim de identificar qual das sequências seria mais eficiente para diminuir a expressão gênica de cada isoforma. Apesar de possuir algumas desvantagens decorrentes especialmente do efeito transiente de silenciamento, o que dificulta a observação de alguns efeitos biológicos a longo prazo e impossibilita a seleção das células transfectadas, o uso inicial destes duplexes sintéticos de RNAi também apresenta algumas vantagens, como o tempo significativamente menor para avaliar a intensidade de silenciamento (12 a 96 horas) e a especificidade de cada sequência de duplexes sobre a isoforma-alvo.

Avaliamos o efeito de diferentes concentrações dos duplexes sintéticos (1, 10, 20 e 50nM) na linhagem tumoral MDA-MB-435 e, em todos os ensaios, as células foram coletadas 2, 4, 5 e 7 dias após a transfecção dos duplexes, a fim de observar a duração do efeito de inibição na expressão do transcrito-alvo.

A linhagem celular tumoral de mama MDA-MB-435 foi escolhida como modelo de estudo porque apresenta altos níveis de expressão do gene ADAM23 e também para efeito de comparação com outros estudos conduzidos previamente em nosso laboratório que haviam utilizado esta linhagem para avaliar o impacto do silenciamento completo do gene ADAM23 em etapas da progressão tumoral (VERBISCK et al. 2009).

O efeito do silenciamento de cada RNAi foi avaliado por meio de reações de amplificação em tempo real, a fim de quantificar a expressão do transcrito-alvo,

relativa à sua expressão na linhagem parental não-transfectada (controle), uma vez que não estão disponíveis comercialmente anticorpos capazes de reconhecer especificamente as proteínas de cada isoforma de ADAM23.

Constatamos que a transfecção das células com 50nM de RNAi produziu um efeito de inibição bem mais duradouro do que as outras concentrações avaliadas. Na figura 11 estão demonstrados os resultados obtidos com os dois duplexes de RNAi para cada isoforma.

Figura 11 – Avaliação do efeito da interferência de RNA de dois duplexes distintos na expressão das isoformas α , β e γ do gene ADAM23. As sequências dos duplexes 1 e 2 de cada isoforma estão demonstradas na figura 3, item 3.8 de *Material e Métodos*. Os níveis de expressão gênica foram analisados previamente à transfecção (dia 0) e nos dias 2, 4, 5 e 7 após a transfecção de 50nM de RNAi específico para cada uma das isoformas na linhagem MDA-MB-435. Os resultados demonstrados no gráfico referem-se aos valores de expressão gênica da isoforma α (**A**), β (**B**) ou γ (**C**) de ADAM23 nas células transfectadas com o RNAi isoforma-específico, em relação às células controle não-transfectadas, incubadas com o agente de transfecção e coletadas no mesmo dia das células transfectadas. Não foi observada inibição cruzada entre as diferentes isoformas, evidenciando 100% de especificidade de inibição entre os duplexes e suas isoformas-alvo. Resultados representativos de dois experimentos independentes.

Podemos observar na figura 11 que o efeito de duplexes de RNAi de sequências diferentes na expressão de um mesmo transcrito-alvo é bastante distinto, como já descrito em diversos trabalhos da literatura (DYKXHOORN et al. 2003; PEI e TUSCHL 2006).

Constatamos que a expressão de ADAM23 α na linhagem tumoral de mama MDA-MB-435 foi reduzida em 100 vezes pelo duplex α 1 e em 50 vezes pelo duplex α 2 no segundo dia após a transfecção (Figura 11A). O efeito inibitório do duplex α 1 na expressão da isoforma α também foi mais estável, mantendo-se próximo a 100 vezes mesmo no quarto dia após a transfecção. Com o duplex α 2, a inibição da expressão começa a diminuir logo após o segundo dia depois da transfecção e, no quarto dia, a redução da expressão é de cerca de 10 vezes.

No caso de ADAM23 β , apenas o duplex β 2 foi capaz de diminuir a expressão gênica satisfatoriamente (18 vezes para o duplex β 2 e 2,5 vezes para o duplex β 1, no segundo dia) (Figura 11B). Apesar disso, a cinética de inibição pelo duplex β 2 foi curta, tendo efeito pouco duradouro, reduzindo-se gradualmente logo após o segundo dia decorrida a transfecção (6 vezes no dia 4; e 2,5 vezes de inibição no dia 5).

Em relação à isoforma γ , o efeito dos dois duplexes de RNAi (γ 1 e γ 2) foi bastante semelhante, sendo que em ambos os casos a diminuição da expressão teve seu pico máximo no segundo dia após a transfecção (25 vezes) e, apesar do efeito ter diminuído um pouco após este dia, somente γ 1 se manteve mais estável até o sétimo dia após a transfecção (dia 7, γ 1 com 17 vezes e γ 2 com 3 vezes de inibição) (Figura 11C).

A fim de avaliar a especificidade do silenciamento de cada RNAi, também analisamos a expressão das outras duas isoformas não-alvo do RNAi nas mesmas

amostras transfectadas. Ou seja, nos ensaios em que utilizamos RNAi para silenciar a isoforma α de ADAM23, por exemplo, também avaliamos a expressão de ADAM23 β e γ , com o intuito de confirmar que o duplex estava silenciando apenas a expressão da isoforma de interesse e não estava exercendo nenhum efeito *off-target*. Em todos os ensaios realizados com RNAi, observamos que os duplexes utilizados tiveram efeito bastante específico para a isoforma-alvo, não interferindo na expressão gênica das demais isoformas (dados não apresentados).

A partir destes resultados, concluímos que as sequências de RNAi $\alpha 1$, $\beta 2$ e $\gamma 1$ foram as mais eficientes no silenciamento da expressão de suas respectivas isoformas-alvo. Além disso, comprovamos que as três sequências tiveram alta especificidade para seu transcrito-alvo, validando a seleção desses três RNAs para a próxima etapa do trabalho.

4.4 Silenciamento estável da expressão das isoformas de splicing α , β e γ do gene ADAM23 na linhagem tumoral de mama MDA-MB-435

Uma vez validadas as sequências capazes de inibir com maior eficiência e especificidade a expressão de cada isoforma de ADAM23, passamos ao silenciamento estável de cada variante na linhagem tumoral de mama MDA-MB-435. O emprego desta estratégia possibilita a seleção de clones celulares a partir da população de células transfectadas, de modo a se obter uma fração celular mais homogênea, com níveis semelhantes de redução do gene de interesse, o que viabiliza a realização de ensaios mais longos e favorece a obtenção de resultados mais confiáveis.

Para o silenciamento estável das isoformas α , β e γ do gene ADAM23, utilizamos o vetor pAVU6+27 (PAUL et al. 2002). Os fragmentos clonados no plasmídeo para formação dos shRNAs isoforma-específicos foram construídos a partir das sequências dos duplexes de RNAi $\alpha 1$, $\beta 2$ e $\gamma 1$. Células MDA-MB-435 foram transfectadas com os plasmídeos recombinantes contendo as construções de interesse e, após a seleção das células que receberam os vetores com o antibiótico neomicina e a expansão das populações resistentes, avaliamos a expressão do transcrito-alvo do shRNA em cada população por reações de amplificação em tempo real, a fim de verificar o efeito do silenciamento de cada construção (Figura 12).

Figura 12 – Avaliação do efeito dos shRNAs α , β e γ na expressão das isoformas do gene ADAM23 na linhagem tumoral MDA-MB-435. As células foram transfectadas com plasmídeos recombinantes contendo shRNAs específicos para silenciar a expressão de cada isoforma individualmente. Após a seleção das células que receberam os plasmídeos, os níveis de expressão gênica do transcrito-alvo do shRNA foram avaliados por reações de amplificação em tempo real. Os resultados demonstrados no gráfico referem-se aos valores de expressão gênica da isoforma-alvo nas células transfectadas com o shRNA α (**A**), β (**B**) ou γ (**C**), ou nas células transfectadas com o vetor sem o inserto (VV, *vetor vazio*), em relação às células não-transfectadas (WT, *wild type*).

Conforme esperado, observamos que a população MDA-MB-435 transfectada com o vetor pAVU6+27 sem o inserto, denominada VV (*vetor vazio*), não apresentou alteração significativa na expressão das três isoformas do gene ADAM23, quando comparada com a linhagem MDA-MB-435 parental não transfectada (WT, *wild type*) (Figura 12).

Em relação às células MDA-MB-435 transfectadas com os vetores plasmidiais contendo shRNAs α , β ou γ , podemos observar na figura 12 que as três construções tiveram efeito de diminuição da expressão de seus transcritos-alvo, mas a intensidade da redução da expressão de cada transcrito foi bastante variável.

No caso das células transfectadas com shRNA cujo alvo era a isoforma α , constatamos uma redução de aproximadamente 9 vezes da expressão do mRNA desta isoforma, quando comparamos com as células WT (controle) (Figura 12A). Considerando a transfecção com shRNA para inibir a isoforma β , observamos que a expressão de ADAM23 β sofreu uma redução de cerca de 5.5 vezes nas células MDA-MB-435 transfectadas, quando comparadas ao controle WT (Figura 12B). Por fim, a população de células MDA-MB-435 transfectadas com shRNA cujo alvo era ADAM23 γ , apresentou diminuição da expressão do mRNA da isoforma-alvo em cerca de 7 vezes, quando comparada às células-controle (Figura 12C).

A partir destes resultados, concluímos que foi possível reduzir a expressão das isoformas α , β e γ do gene ADAM23 utilizando vetores plasmidiais que expressam shRNAs estavelmente. Entretanto, para as três construções utilizadas, o nível de diminuição da expressão de cada isoforma foi menor do que o esperado.

Sendo assim, decidimos isolar clones a partir das populações derivadas da linhagem tumoral MDA-MB-435 transfectadas com os shRNAs α , β ou γ , com o intuito de se obter células expressando o shRNA ainda mais homoganeamente do

que a população de origem, e visando a obtenção de derivados clonais com maior silenciamento da expressão da isoforma de interesse.

Isolamos 10 clones derivados da população Alfa, 9 clones derivados de Beta e 10 clones derivados de Gama, além de 5 clones derivados da população transfectada com o vetor vazio, e analisamos nestes clones os níveis de expressão das isoformas α , β e γ por reações de amplificação em tempo real (Figura 13).

Figura 13 – Avaliação da expressão das isoformas do gene ADAM23 em clones isolados das populações Alfa (**A**), Beta (**B**), Gama (**C**) e VV (vetor vazio) (**D**). Os clones foram isolados a partir das populações MDA-MB-435 expressando estavelmente shRNAs específicos para silenciar a expressão de cada isoforma individualmente. Após a expansão clonal, os níveis de expressão gênica dos transcritos-alvo do shRNA foram avaliados por reações de amplificação em tempo real. Nos clones isolados da população VV (vetor vazio), foram avaliadas as expressões das três isoformas. (**A-C**) Os resultados demonstrados no gráfico referem-se aos valores de expressão gênica da isoforma-alvo nos clones expressando o shRNA α (A1-A10), β (B1-B9) ou γ (G1-G11), em relação à linhagem MDA-MB-435 parental (WT). (**D**) Para os clones isolados da população VV (VV1-VV5), estão representados os valores de expressão gênica das três isoformas separadamente, relativos à sua expressão nas células não-transfectadas (WT).

Os derivados clonais isolados das populações MDA-MB-435 que expressam estavelmente shRNA α , β ou γ apresentaram grande variabilidade na diminuição da expressão da isoforma-alvo do RNAi (Figura 13).

Considerando os clones isolados da população Alfa, constatamos que o clone A2 apresentou o maior silenciamento de ADAM23 α dentre os 10 avaliados (mais de 100 vezes de diminuição da expressão desta isoforma, quando comparado à sua expressão na linhagem parental MDA-MB-435), seguido pelos clones A6, A7, A8 e A10 (redução de aproximadamente 10 vezes da expressão da isoforma α) (Figura 13A). Nestes clones (exceto A2), o nível de diminuição da expressão da isoforma α foi ligeiramente maior do que o observado na população Alfa (9 vezes, Figura 12A).

Em relação à isoforma β , os clones isolados da população Beta que apresentaram maior redução da expressão desta isoforma foram B3 e B8 (redução de aproximadamente 3.5 e 4.5 vezes, respectivamente), o que é ligeiramente inferior ao resultado obtido com a população da qual foram isolados (redução de 5.5 vezes da expressão da isoforma β , Figura 12B). Nos demais clones avaliados, a redução da expressão de ADAM23 β foi ainda menor (cerca de 1 ou 2 vezes) (Figura 13B).

Para os clones isolados da população Gama, verificamos que G4 e G11 apresentaram a maior redução da expressão de ADAM23 γ (100 e 50 vezes, respectivamente), quando comparados à expressão desta isoforma nas células MDA-MB-435 WT (Figura 13C). Os clones G5, G7, G8 e G9 também apresentaram uma redução significativa da expressão da isoforma γ (em torno de 35 vezes) (Figura 13C). Nestes 6 clones, a redução da expressão de ADAM23 γ foi maior do que o observado na população Gama (7 vezes, Figura 12C).

Além dos clones que expressam shRNA α , β ou γ , também isolamos 5 clones da população MDA-MB-435 transfectada com o vetor pAVU6+27 vazio (VV1-VV5). Nestes clones, avaliamos a expressão das três isoformas do gene ADAM23 e verificamos que não houve alteração significativa da expressão de nenhuma das isoformas em nenhum dos clones selecionados, ao compararmos com sua expressão na linhagem parental (WT) (Figura 13D).

Em vista destes resultados, utilizamos alguns critérios para definir quais dos derivados clonais obtidos seriam empregados como ferramenta de estudo da função de cada isoforma do gene ADAM23 no restante do trabalho. Os critérios utilizados foram: (1) os níveis de redução da expressão do transcrito-alvo do shRNA deveriam ser os maiores possíveis, quando comparados aos níveis de expressão das células parentais e das células transfectadas com o vetor plasmidial vazio; (2) os derivados selecionados não poderiam apresentar reduções nos níveis de expressão do mRNA das duas isoformas não-alvo do shRNA; (3) os clones deveriam apresentar um silenciamento estável da isoforma-alvo ao longo do tempo de cultivo, ou seja, durante a manutenção das células em cultura após longos intervalos de tempo (30-60 dias) os níveis de redução da expressão da isoforma-alvo deveriam ser constantes e específicos e; (4) deveriam ser isolados, pelo menos, dois clones

independentes de cada construção, que obedecessem aos critérios 1 a 3 acima, a fim de discriminarmos entre os efeitos específicos da redução de expressão de cada isoforma das meras variações clonais. Desta forma, somente seriam consideradas alterações fenotípicas específicas de cada isoforma aquelas que fossem comuns aos dois clones da mesma construção.

Na figura 14 apresentamos o perfil de expressão dos mRNAs das três isoformas de ADAM23 nos clones derivados da linhagem MDA-MB-435 em que constatamos diminuição específica e estável da expressão da isoforma-alvo do RNAi: clones A8 e A10 (clones expressando a construção shRNA α), clones B3 e B8 (clones expressando a construção shRNA β) e clones G5 e G11 (clones expressando a construção shRNA γ), além dos clones VV1 e VV2, transfectados com o vetor pAVU6+27 vazio. Nesta figura estão reunidos os resultados obtidos pela análise da expressão absoluta de cada isoforma individualmente em todos os clones selecionados, em dois momentos distintos: após 10 dias em cultura (número de passagens igual a 3) e após 60 dias em cultura (número de passagens igual a 20) (Figura 14).

Figura 14 – Expressão absoluta das isoformas α , β e γ do gene ADAM23 em derivados clonais da linhagem MDA-MB-435 que expressam estavelmente shRNAs construídos para silenciar a expressão de cada isoforma separadamente. Os resultados demonstrados no gráfico representam os níveis de expressão gênica absolutos de cada isoforma isoladamente na linhagem parental MDA-MB-435 não-transfectada (WT) e nos clones que expressam estavelmente shRNAs cujo alvo são os transcritos de ADAM23 α (A8 e A10), ADAM23 β (B3 e B8) ou ADAM23 γ (G5 e G11), além de clones expressando o vetor pAVU6+27 sem o inserto (VV1 e VV2). Também estão demonstrados os níveis absolutos de expressão das isoformas no clone A23neg, que apresenta o completo silenciamento de ADAM23 (i.e., as três isoformas de splicing). Os valores representados no gráfico referem-se à média $\pm$ SEM da expressão absoluta de cada isoforma em dois experimentos independentes (células coletadas na 3ª e na 20ª passagem, durante o cultivo celular), normalizados pela expressão absoluta do gene endógeno HMBS.

Ao avaliarmos a especificidade do silenciamento de cada isoforma do gene ADAM23 nos clones derivados da linhagem MDA-MB-435 que apresentaram diminuição significativa da expressão da isoforma-alvo do shRNA por eles expresso, verificamos que não houve alteração significativa da expressão das outras duas

isoformas não-alvo do RNAi em nenhum dos clones analisados (Figura 14). Este resultado era esperado, uma vez que as sequências de RNAi utilizadas para silenciar cada isoforma do gene ADAM23 individualmente tinham como alvo exons expressos exclusivamente por cada uma das isoformas (Figura 3, página 66, item 3.8 de *Material e Métodos*).

Uma vez confirmado o silenciamento isoforma-específico, analisamos sua estabilidade através da avaliação da expressão gênica das isoformas em diferentes amostras de cada clone coletadas a partir de 10 dias e ao longo de 60 dias de cultivo. As médias entre os níveis de expressão absoluta das isoformas obtidos em dois experimentos realizados com as células coletadas durante este intervalo de tempo de cultivo estão demonstradas na figura 14. Neste caso, os pequenos valores de erro padrão demonstram a estabilidade do efeito do RNAi, uma vez que verificamos que a redução da expressão das isoformas foi mantida constante e específica durante o período avaliado em todos os clones expressando shRNAs α , β ou γ que foram selecionados.

Nos clones A8 e A10, verificamos uma diminuição nos níveis de expressão de ADAM23 α de aproximadamente 8 e 10 vezes, respectivamente, quando comparados à sua expressão na linhagem parental MDA-MB-435 (Figura 14). Em relação aos clones B3 e B8, observamos uma redução de 5 e 2 vezes da expressão da isoforma β , respectivamente, em relação à sua expressão nas células-controle (Figura 14). Por fim, nos clones G5 e G11, constatamos redução de aproximadamente 40 e 25 vezes da expressão de ADAM23 γ , respectivamente, em relação à sua expressão no controle MDA-MB-435 WT (Figura 14).

Além dos clones transfectados com shRNAs para inibição da expressão de cada isoforma de ADAM23 individualmente, avaliamos os níveis de expressão de

cada isoforma no clone A23neg, um derivado clonal da linhagem MDA-MB-435 que expressa uma construção de shRNA cujo alvo é uma região comum às três isoformas de splicing (VERBISCK et al. 2009). Conforme esperado, não detectamos a expressão de nenhuma das isoformas nas células A23neg, confirmando o completo silenciamento do gene ADAM23 neste clone (Figura 14).

É importante mencionar que a estabilidade e a especificidade do RNAi foram avaliadas em muitos outros derivados clonais, alguns dos quais apresentaram, na análise inicial, níveis de redução da expressão da isoforma-alvo do shRNA maiores do que os dos clones reunidos na figura 14, como A2 e G4. Entretanto, surpreendentemente, constatamos efeito inespecífico do RNAi em alguns clones e, em decorrência disto, eles foram descartados (resultados não demonstrados).

Uma vez selecionados os derivados clonais da linhagem tumoral de mama MDA-MB-435 com diminuição estável e específica da expressão da isoforma α , β ou γ do gene ADAM23 separadamente, estes foram utilizados como ferramentas para alcançar o segundo objetivo principal deste estudo, que consiste em investigar a função biológica de cada isoforma individualmente.

Para facilitar a compreensão e a análise dos dados, nos resultados dos experimentos apresentados a seguir, os clones utilizados passarão a ser denominados de acordo com o nível de redução da expressão da isoforma-alvo do shRNA por eles expresso. Ou seja, os clones A8 e A10 permanecerão com esta mesma denominação, uma vez que a expressão de ADAM23 α está reduzida em 8 e 10 vezes nestes clones, respectivamente. Já os clones B3 e B8 serão mencionados como B5 e B2, respectivamente, pois nestes clones foi observada redução de 5 e 2 vezes da expressão de ADAM23 β . Por fim, os derivados clonais G5 e G11, em que

verificamos diminuição de 40 e 25 da expressão de ADAM23 γ , respectivamente, passarão a ser denominados G40 e G25.

4.5 Impacto da redução da expressão das isoformas do gene ADAM23 na proliferação e na sobrevivência da linhagem MDA-MB-435

O primeiro efeito biológico que investigamos nos clones derivados da linhagem MDA-MB-435 com redução da expressão de cada isoforma do gene ADAM23 foi o impacto sobre a capacidade proliferativa das células. Inicialmente, avaliamos a taxa de crescimento de cada um dos clones mantidos em monocamada (cultura bidimensional ou 2-D) (Figura 15 e Tabela 3).

Figura 15 – Avaliação da proliferação em cultura bidimensional dos derivados clonais da linhagem MDA-MB-435 com diminuição da expressão das isoformas α (A8 e A10), β (B2 e B5) ou γ (G25 e G40) do gene ADAM23, além dos clones que expressam o vetor pAVU6+27 vazio (VV1 e VV2) e do clone com completo silenciamento do gene ADAM23 (A23neg), em comparação às células-controle (WT). 5000 células/ cm^2 foram plaqueadas em monocamada e mantidas em cultura durante oito dias. Para monitorar seu crescimento, as células foram tripsinizadas e quantificadas em câmara de

Neubauer diariamente. Estão representados os valores da média $\pm$ SEM, obtidos em três experimentos independentes.

Tabela 3 – Tempo de dobramento da linhagem MDA-MB-435 WT e de seus derivados clonais com redução da expressão das isoformas α , β ou γ do gene ADAM23, além dos clones VV1, VV2 e A23neg, calculado a partir da fase logarítmica das curvas de proliferação celular em cultura bidimensional. Estão representados os valores da média $\pm$ SEM, em horas, obtidos em três experimentos independentes. Para a comparação entre os grupos, foi empregado o teste estatístico ANOVA e o pós-teste de Tukey. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados em que $p < 0.05$ (*).

Célula	Tempo médio de dobramento (h)
WT	23.11 ($\pm$ 0.46)
VV1	23.87 ($\pm$ 1.42)
VV2	24.78 ($\pm$ 0.67)
A8	23.98 ($\pm$ 2.43)
A10	24.44 ($\pm$ 1.85)
B2	22.51 ($\pm$ 0.48)
B5	26.02 ($\pm$ 0.54)
G25	24.57 ($\pm$ 1.56)
G40	25.50 ($\pm$ 0.55)
A23neg	21.04 ($\pm$ 0.91)

Os resultados apresentados na figura 15 e na tabela 3 demonstram que a redução específica da expressão de cada isoforma de ADAM23 não interferiu no comportamento proliferativo de células MDA-MB-435 cultivadas em monocamada (2-D), uma vez que a cinética de proliferação e os tempos de dobramento celular, calculados a partir da fase logarítmica de suas cinéticas de proliferação, são muito semelhantes entre as células MDA-MB-435 WT e seus derivados clonais.

Apesar de apresentar tempo de dobramento ligeiramente inferior às células MDA-MB-435 WT, não verificamos diferença significativa entre a taxa de crescimento em 2-D das células com silenciamento completo do gene ADAM23

(A23neg, $21.04 \pm 0.9h$) e as células-controle ($23.11 \pm 0.4h$, $p > 0.05$), comprovando os dados anteriormente publicados por VERBISCK et al. (2009). Este resultado demonstra que a redução individual da expressão de cada isoforma do gene ADAM23 ou o silenciamento total deste gene (i.e., representativo de algum efeito cooperativo entre as três isoformas) não interferem na capacidade proliferativa da linhagem tumoral MDA-MB-435 em condições padrão de cultivo em 2-D (meio de cultura com soro e em condições aderentes em placas não-sensibilizadas com substrato, em cultura bidimensional).

Muitos trabalhos da literatura demonstram que o contato célula-célula é um importante fator de regulação da proliferação celular (WEAVER et al. 1997; WANG et al. 1998; LIU et al. 2004). Uma vez que as células MDA-MB-435, quando em monocamada, apresentam poucos pontos de contato célula-célula (Figura 19), tais efeitos de controle da proliferação seriam minimizados nestas condições de cultivo.

Um sistema alternativo de cultivo celular, denominado de cultivo tridimensional ou em 3-D, representa um modelo intermediário ao 2-D de células em cultura e ao complexo sistema de organização das células *in vivo*, uma vez que recapitula boa parte das interações célula-célula e célula-matriz extracelular, permitindo a deflagração de vias de sinalização dependentes destas interações (YAMADA e CUKIERMAN 2007).

Tendo em vista estas informações, e considerando que muitos membros da família ADAM podem modular interações célula-célula e célula-matriz, decidimos avaliar o impacto da redução da expressão de cada isoforma do gene ADAM23 individualmente na capacidade de proliferação da linhagem MDA-MB-435 cultivada em condições tridimensionais, empregando o sistema de formação de esferóides multicelulares *in vitro*.

Para isto, produzimos esferóides multicelulares por agregação espontânea das células MDA-MB-435 *in vitro* utilizando células de cada um dos clones derivados da linhagem MDA-MB-435 com diminuição da expressão das isoformas de ADAM23. Previamente à análise da taxa de proliferação celular, avaliamos os níveis de expressão das isoformas por reações de amplificação em tempo real, a fim de verificar se o efeito dos shRNAs α , β e γ observado nos clones cultivados em monocamada era mantido na cultura tridimensional (Figura 16).

Figura 16 – Expressão absoluta das isoformas α , β e γ do gene ADAM23 nos derivados clonais da linhagem MDA-MB-435 que expressam estavelmente shRNAs α , β ou γ cultivados em condições tridimensionais, para formação de esferóides multicelulares. Os resultados demonstrados no gráfico representam os níveis de expressão gênica absolutos de cada isoforma individualmente em esferóides formados pelas células parentais MDA-MB-435 (WT) ou pelos clones que expressam shRNAs isoforma-específicos, além de esferóides formados pelos clones transfectados com o vetor vazio (VV1 e VV2), e esferóides formados pelas células A23neg, que não expressam nenhuma das isoformas do gene ADAM23. Estão demonstrados os valores da média $\pm$ SEM da expressão absoluta de cada isoforma em dois experimentos independentes, normalizados pela expressão absoluta do gene endógeno HMBS.

Inicialmente, observamos que a expressão absoluta das três isoformas do gene ADAM23 é ligeiramente maior nas células MDA-MB-435 cultivadas em modelo tridimensional do que nas células cultivadas em monocamada (aumento de aproximadamente 1.6 vezes no número de cópias das três isoformas) (Figuras 14 e 16).

Ao avaliar os níveis de expressão das isoformas de ADAM23 nos derivados clonais da linhagem MDA-MB-435 que expressam shRNAs α , β ou γ cultivados em 3-D, verificamos que os efeitos dos shRNAs na expressão de seus transcritos-alvo observados nas células cultivadas em monocamada são atenuados em alguns dos clones cultivados em sistema tridimensional (Figura 16).

No clone A8, em que constatamos redução de 8 vezes da isoforma α em condições 2-D de cultivo (Figura 14), verificamos uma diminuição de cerca de 3.5 vezes da expressão desta isoforma quando as células A8 foram cultivadas em 3-D, quando comparamos com sua expressão nos esferóides formados pelas células MDA-MB-435 parentais (Figura 16).

Nos esferóides formados pelos clones G25 e G40, verificamos redução da expressão de ADAM23 γ de 10 e 8 vezes, respectivamente, quando comparada à expressão desta isoforma nos esferóides formados pelas células MDA-MB-435 WT (Figura 16), resultado inferior ao que havíamos verificado quando estes clones foram cultivados em sistema bidimensional (redução de 25 e 40 vezes da expressão da isoforma γ no clones G25 e G40, respectivamente) (Figura 14).

No clone A10, que expressa shRNA α , e nos clones B2 e B5, que expressam shRNA β , não observamos alterações significativas na expressão das isoformas-alvo do RNAi entre as células cultivadas em 2-D ou em 3-D (Figuras 14 e 16), demonstrando efeito semelhante do RNAi nas duas condições de cultivo.

É interessante ressaltar que nas células A23neg, que não expressam nenhuma das isoformas de ADAM23 quando cultivadas em monocamada (Figura 14), também não constatamos expressão de nenhuma das isoformas quando cultivadas em condições 3-D, ou seja, nos esferóides formados por A23neg, o gene ADAM23 permanece completamente silenciado (Figura 16). Vale enfatizar também que a especificidade dos shRNAs α , β e γ na expressão de suas isoformas-alvo verificada nas células cultivadas em 2-D (Figura 14) foi mantida em todos os esferóides multicelulares (Figura 16).

Uma vez constatada que a expressão das isoformas de ADAM23 permanece reduzida nos derivados clonais da linhagem MDA-MB-435 cultivados em sistemas tridimensionais, avaliamos o efeito da redução da expressão de cada isoforma na proliferação da linhagem MDA-MB-435 cultivada em 3-D. A taxa de proliferação dos esferóides formados por cada um dos clones foi quantificada por marcação indireta no DNA das células presentes na fase S do ciclo celular, através da incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) e posterior reação de imunocitoquímica (Figura 17).

A

Figura 17 – Avaliação do efeito da redução da expressão das isoformas α , β ou γ do gene ADAM23 na taxa de incorporação de BrdU da linhagem MDA-MB-435 cultivada em esferóides (modelo tridimensional). As células MDA-MB-435 WT e seus derivados clonais com diminuição da expressão de cada isoforma do gene ADAM23 (A8, A10, B2, B5, G25 e G40) ou das três isoformas simultaneamente (A23neg), bem como os clones que expressam o vetor pAVU6+27 vazio (VV1 e VV2), foram plaqueadas sobre superfícies não-aderentes para formação de esferóides multicelulares por agregação espontânea. Quatro dias após o plaqueamento, os esferóides foram incubados com BrdU (0.1mg/ml) durante seis horas. Para detectar as células que incorporaram BrdU em seu DNA, foi realizada a reação com anticorpo anti-BrdU e a marcação dos núcleos celulares com DAPI, e o resultado foi analisado em microscópio de fluorescência. **A** - Imagens representativas das células MDA-MB-435 WT e de seus derivados clonais A10 e G40, cultivados em condições 3-D, após a marcação com os reagentes DAPI (coluna da esquerda) e BrdU (coluna da direita). A barra representa 100 μ m. **B** - Taxa de incorporação de BrdU. Para a quantificação das células marcadas, foram contadas 1000 células/esferóide, em um total de seis esferóides para cada derivado clonal (n=6000 células/clone). Estão representados os valores da média $\pm$ SEM, obtidos em dois experimentos independentes (três esferóides/experimento para cada clone). Para a análise dos resultados foi empregado o teste estatístico ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. (***) $p < 0.001$, resultados estatisticamente significativos para os dois clones com redução da expressão da mesma isoforma de ADAM23, em relação ao controle MDA-MB-435 WT.

Podemos observar na figura 17 que, conforme esperado, não verificamos diferença significativa entre o número de células BrdU-positivas nos esferóides formados por derivados clonais de MDA-MB-435 que expressam o vetor vazio (233 ± 12 células em VV1 e 245 ± 5 células em VV2) e os esferóides formados pelas células parentais (257 ± 6 células marcadas, $p > 0.05$).

A redução individual da expressão das isoformas α ou β de ADAM23 não alterou significativamente a taxa de incorporação de BrdU no DNA das células MDA-MB-435 cultivadas em modelo tridimensional (Figura 17). Em A8 e A10, constatamos 298 ± 15 e 314 ± 6 células BrdU-positivas, respectivamente, enquanto em B2 e B5, verificamos 243 ± 5 e 281 ± 5 células marcadas por BrdU ($p > 0.05$).

Diferentemente das outras isoformas, a diminuição da expressão da isoforma γ promoveu um aumento significativo da quantidade de células MDA-MB-435

cultivadas em 3-D que percorreram a fase S do ciclo celular durante as seis horas de incubação com BrdU, quando comparamos com os esferóides formados pelas células parentais (Figura 17). Em G25 e G40, verificamos 329 ± 14 e 330 ± 17 células BrdU-positivas, respectivamente, o que representa um aumento de 28% na quantidade de células marcadas destes dois clones, em comparação aos esferóides constituídos pelas células WT (257 ± 6 células marcadas, $p < 0.001$). Estes resultados sugerem indiretamente que a redução da isoforma γ de ADAM23 é capaz de aumentar a capacidade proliferativa da linhagem MDA-MB-435 em condições 3-D de cultivo, mas não em condições 2-D.

É interessante destacar que o silenciamento total de ADAM23 (A23neg) produz efeito oposto ao observado pela redução individual da expressão da isoforma γ . Nos esferóides formados por células A23neg, verificamos diminuição significativa do número de células BrdU-positivas, quando comparados aos esferóides formados pelas células parentais (170 ± 2 versus 257 ± 6 células marcadas, respectivamente, $p < 0.001$, Figura 17), sugerindo a existência de um efeito coordenado entre as isoformas neste processo. Ou seja, quando há diminuição da expressão de apenas uma das isoformas de ADAM23, as outras duas atuam de modo a compensar sua atividade, produzindo efeito distinto daquele observado quando as três isoformas estão silenciadas simultaneamente.

Dando continuidade ao estudo, decidimos investigar o impacto da diminuição da expressão de cada isoforma de ADAM23 na capacidade de sobrevivência livre de ancoragem da linhagem MDA-MB-435, fenótipo que, juntamente com a capacidade de proliferação celular em 3-D, está diretamente associado à malignidade, incluindo maior tumorigenicidade, e a um maior potencial metastático das células tumorais (SAIGA et al. 1987; LI et al. 1989). Para tanto, realizamos experimentos de

clonogênese independente de ancoragem (i.e., ensaios de formação de colônias em soft-ágar) e analisamos a quantidade de colônias formadas por cada tipo celular (Figura 18).

A **B**

Figura 18 – Avaliação do impacto da redução da expressão das isoformas α , β ou γ do gene ADAM23 na capacidade de sobrevivência livre de ancoragem da linhagem MDA-MB-435 em sistema tridimensional. Células MDA-MB-435 WT e seus derivados celulares com diminuição da expressão da isoforma α (A8 e A10), β (B2 e B5) ou γ (G25 e G40), bem como o clone com completo silenciamento do gene ADAM23 (A23neg) e os clones que expressam o vetor pAVU6+27 vazio (VV1 e VV2), foram ressuspensos em meio de cultura completo (i.e., contendo 10% de soro fetal bovino) e 500 células isoladas foram semeadas em uma matriz de agarose 0.3% contendo meio de cultura completo. As células foram incubadas em estufa a 37°C durante 21 dias, para permitir a formação e o crescimento de colônias. Após este período, os resultados foram analisados em microscópio e a quantidade de colônias formadas foi quantificada utilizando o programa computacional *Image J*. **A** - Imagens representativas da linhagem MDA-MB-435 parental (WT) e de seus derivados celulares, coletadas no instante em que foram obtidos os resultados demonstrados em **B** (barra, 1mm). **B** - Número médio $\pm$ SEM de colônias formadas por cada tipo celular, obtidos em três experimentos independentes. A diferença entre as células foi avaliada empregando-se o teste estatístico ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados em que $p < 0.05$ (*) para os dois clones com redução da expressão da mesma isoforma de ADAM23, em relação às células-controle MDA-MB-435 WT.

Podemos observar na figura 18 que a redução individual da expressão das isoformas α , β ou γ de ADAM23, ou das três isoformas simultaneamente, não alterou a quantidade de colônias formadas pela linhagem MDA-MB-435 de modo significativo.

Nos derivados celulares da linhagem MDA-MB-435 com redução da expressão da isoforma α , verificamos 157 ± 5 e 120 ± 11 colônias formadas pelos clones A8 e A10, respectivamente, enquanto nas células MDA-MB-435 WT, constatamos 163 ± 14 colônias ($p > 0.05$, Figura 18B). Nos clones B2 e B5, com redução da expressão da isoforma β , observamos uma quantidade de colônias muito semelhante à das células-controle (152 ± 12 e 142 ± 8 colônias nos clones B2 e B5, respectivamente, $p > 0.05$). Resultados similares foram verificados nos clones com diminuição da expressão da isoforma γ , G25 e G40 (164 ± 15 e 153 ± 12 colônias, respectivamente, $p > 0.05$, Figura 18B).

Variações não-significativas na quantidade de colônias formadas pelos derivados clonais da linhagem MDA-MB-435 também foram constatadas nos clones que expressam o vetor pAVU6+27 vazio, VV1 e VV2 (100 ± 11 e 142 ± 2 colônias, respectivamente, $p > 0.05$), confirmando que as variações observadas não consistem em efeitos específicos da diminuição da expressão das isoformas. O silenciamento completo do gene ADAM23 também não alterou significativamente o número de colônias formadas pela linhagem MDA-MB-435 (196 ± 12 colônias formadas pelas células A23neg, $p > 0.05$, Figura 18B).

Em vista destes resultados, concluímos que a diminuição da expressão de cada isoforma de ADAM23 não interfere na capacidade de sobrevivência das células MDA-MB-435 em condições livre de ancoragem.

4.6 Alterações morfológicas na linhagem tumoral MDA-MB-435 decorrentes da diminuição da expressão das isoformas α ou γ do gene ADAM23

Durante o cultivo em sistema bidimensional dos derivados clonais da linhagem MDA-MB-435 com redução da expressão de cada isoforma de ADAM23, observamos que os clones com diminuição da expressão das isoformas α ou γ apresentavam morfologia distinta das células parentais e dos clones com diminuição da expressão da isoforma β .

As células MDA-MB-435 WT, bem como seus derivados clonais transfectados com o vetor pAVU6+27 vazio (VV1 e VV2), possuem fenótipo do tipo mesenquimal, caracterizado por aspecto estreito e bastante alongado. Morfologia semelhante é exibida pelos clones B2 e B5 e também pelas células que não expressam nenhuma das isoformas de ADAM23 (A23neg) (Figura 19).

No caso dos clones com diminuição da expressão de ADAM23 γ , G25 e G40, observamos que as células são menos alongadas e mais arredondadas, fenótipo que se torna mais intenso com o aumento da densidade celular (Figura 19). Além disso, ao contrário das células MDA-MB-435 parentais e de seus demais derivados celulares em estudo, as células G25 e G40 não se espalham por toda a superfície das placas de cultura, i.e., não ocupam completamente a área disponível quando estão em alta densidade. Ao invés disso, elas se empilham umas sobre as outras à medida que proliferam, até se desprenderem da superfície da placa, formando agregados flutuantes, o que não é observado nas outras células. Curiosamente, os agregados celulares de G25 e G40 que se desprendem das placas de cultura em alta densidade não são formados por células mortas, mas sim por células vivas (aproximadamente 90% de viabilidade), como comprovado por testes de viabilidade celular por exclusão com *trypan blue*, e estas células voltam a aderir e a proliferar quando transferidas para uma nova placa de cultura em baixa densidade.

É importante enfatizar que, conforme descrito anteriormente, não verificamos diferença entre a taxa de proliferação dos clones G25 e G40 e as demais células cultivadas em condições bidimensionais (Figura 15), o que comprova que as alterações morfológicas observadas nas células com redução da expressão de ADAM23 γ cultivadas em 2-D não interferem em seu comportamento proliferativo.

Alterações morfológicas também foram observadas nas células com diminuição da expressão de ADAM23 α , mas com menor intensidade, quando comparadas a G25 e G40 (Figura 19). As células A8 e A10 também são ligeiramente arredondadas, destacando-se o clone A10, que apresenta morfologia semelhante à das células com redução da expressão da isoforma γ , porém em intensidade reduzida. Entretanto, ao contrário dos clones G25 e G40, as células A8 e A10

espalham-se por toda a superfície das placas de cultura e não se desprendem quando em alta densidade, evidenciando um fenótipo intermediário entre as células com diminuição da expressão de ADAM23 γ e as demais células avaliadas. As alterações morfológicas verificadas nos clones com diminuição da expressão da isoforma α cultivados em sistema bidimensional também não interferiram em sua taxa de crescimento (Figura 15).

Estas observações sugerem que a diminuição da expressão das isoformas α ou γ de ADAM23 na linhagem MDA-MB-435 altera suas propriedades adesivas e/ou sua capacidade de espraiamento. Entretanto, estas isoformas parecem atuar em intensidades distintas, ou, talvez, de modos diferentes, uma vez que o efeito causado na morfologia celular em decorrência da redução da expressão de cada uma delas não foi o mesmo.

Figura 19 – Imagens representativas da linhagem MDA-MB-435 parental (WT) e de seus derivados clonais com redução da expressão da isoforma α (A8 e A10), β (B2 e B5) ou γ (G25 e G40) do gene ADAM23, além de clones que expressam o vetor vazio (VV1 e VV2), mantidos em condições padrão de cultivo (i.e., células em meio de cultura acrescido de 10% de soro fetal e cultivadas em placas não-sensibilizadas com substrato). Também está representado o clone A23neg, em que há o completo silenciamento do gene ADAM23 (i.e., das três isoformas). Barra representativa de 200 μ m.

A fim de aprofundar o estudo do efeito da redução da expressão individual das isoformas de ADAM23 na alteração do fenótipo da linhagem tumoral MDA-MB-435, avaliamos sua morfologia e a de seus derivados clonais em diferentes componentes de matriz extracelular, como fibronectina, colágeno I e matrigel. O matrigel consiste em uma matriz protéica composta por diferentes proteínas, majoritariamente laminina, seguida por colágeno IV, proteoglicanos e entactina, cuja composição mimetiza a constituição fisiológica da matriz extracelular (KLEINMAN et al. 2005).

Para tanto, as células foram ressuspensas em meio de cultura sem soro e adicionadas em placas de cultura previamente sensibilizadas com cada um dos substratos ou em placas não-sensibilizadas e tratadas apenas com meio de cultura completo (i.e., com 10% de soro fetal), para efeito de comparação com os diferentes substratos. Após a incubação das células em estufa a 37°C durante 28 horas, avaliamos a morfologia celular em microscópio (Figura 20).

A **B**

Figura 20 - Avaliação da morfologia celular da linhagem MDA-MB-435 e de seus derivados com redução da expressão das isoformas α , β ou γ do gene ADAM23 em diferentes componentes da matriz extracelular. As células MDA-MB-435 WT e seus derivados clonais com redução da expressão da isoforma α (A8 e A10), β (B2 e B5) ou γ (G25 e G40), bem como o clone com silenciamento das três isoformas de ADAM23 (A23neg), e os clones transfectados com o vetor vazio (VV1 e VV2), foram ressuspensos em meio de cultura sem soro e semeados em placas de cultura previamente sensibilizadas com fibronectina (10 μ g/ml), colágeno I (10 μ g/ml) ou matrigel (500 μ g/ml), ou em placas não-tratadas com substratos, contendo meio de cultura com 10% de soro fetal. Após incubação das células em estufa a 37°C durante 28 horas, a morfologia celular foi analisada em microscópio. **A** – Imagens representativas da linhagem MDA-MB-435 parental (WT) e dos clones VV2, A10, B5, G40 e A23neg, nos diferentes substratos avaliados, coletadas no instante em que foram obtidos os resultados demonstrados nos gráficos em **B** (barra, 100 μ m). **B** – Área média das células MDA-MB-435 WT e de seus derivados clonais, quantificada utilizando o programa computacional *Image J*. Estão representados nos gráficos os valores médios $\pm$ SEM das áreas das células (μ m²) (n=100) em cada condição avaliada. A diferença entre as células foi analisada empregando-se o teste estatístico ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. (*) p<0.05 e (***) p<0.001, resultados estatisticamente significativos para os dois clones com redução da expressão da mesma isoforma de ADAM23, em relação às células WT.

Conforme demonstrado na figura 20, verificamos que a redução da expressão das isoformas α ou γ de ADAM23 alterou significativamente a morfologia da linhagem MDA-MB-435 não só em condições padrão de cultivo (i.e., em meio de cultura com soro fetal e em placas não-sensibilizadas com substrato), como descrito anteriormente (Figura 19), mas também em componentes específicos da matriz extracelular.

É importante ressaltar que avaliamos a morfologia da linhagem MDA-MB-435 e de seus derivados celulares nos diferentes substratos por meio da comparação entre as áreas celulares médias obtidas 28 horas após as células terem sido semeadas, de modo que as etapas de adesão e de espraiamento celular, que se desenrolam nas primeiras horas pós-plaqueamento, já haviam sido concluídas.

A diminuição da expressão de ADAM23 γ provocou alterações significativas na morfologia das células MDA-MB-435 em todos os substratos avaliados, conferindo-

lhes um aspecto arredondado (Figura 20). Em fibronectina e matrigel, verificamos que a área celular média dos clones G25 e G40 foi de aproximadamente $245 \pm 6 \mu\text{m}^2$, resultado similar à área das células WT em suspensão ($200 \mu\text{m}^2$, Figura 23B) e significativamente distinto do que foi observado com as células parentais (área celular média igual a $390 \pm 8 \mu\text{m}^2$ nos dois substratos, $p < 0.001$, Figura 20B). Em colágeno I, os clones G25 e G40 apresentaram área celular média igual a $300 \pm 7 \mu\text{m}^2$ e $286 \pm 7 \mu\text{m}^2$, respectivamente, medida que difere significativamente das células WT ($420 \pm 11 \mu\text{m}^2$, $p < 0.001$, Figura 20B).

Finalmente, observamos que área celular média dos dois clones com redução da expressão da isoforma γ em placas não-sensibilizadas com substrato e em meio de cultura contendo soro fetal foi igual a $310 \pm 9 \mu\text{m}^2$, enquanto para as células MDA-MB-435 WT, verificamos área média igual a $394 \pm 10 \mu\text{m}^2$ ($p < 0.001$, Figura 20B). Este resultado comprova de forma quantitativa as alterações morfológicas permanentes verificadas nas células com diminuição da expressão da isoforma γ durante seu cultivo, conforme descrito anteriormente e representado na figura 19, e corrobora nossa hipótese de que esta isoforma tem papel fundamental na regulação da morfologia da linhagem MDA-MB-435.

Considerando a isoforma α , observamos que a diminuição de sua expressão provocou alterações significativas na morfologia da linhagem MDA-MB-435 em substrato de colágeno I e em matrigel (Figura 20). Em colágeno I, verificamos que a área celular média dos clones A8 e A10 foi igual a $345 \pm 10 \mu\text{m}^2$ e $320 \pm 9 \mu\text{m}^2$, respectivamente, enquanto nas células parentais, verificamos área média igual a $420 \pm 11 \mu\text{m}^2$ ($p < 0.001$, Figura 20B). Em matrigel, constatamos área média do clone A8 igual a $351 \pm 8 \mu\text{m}^2$ e do clone A10 igual a $283 \pm 8 \mu\text{m}^2$, sendo que a área média das

células-controle foi igual a $390 \pm 8 \mu\text{m}^2$ ($p < 0.05$, Figura 20B). Em substrato de fibronectina e em meio de cultura com soro fetal, não constatamos alterações significativas na morfologia celular dos dois clones com redução da expressão de ADAM23 α , demonstrando que esta isoforma não interfere neste processo e participa do controle da morfologia das células MDA-MB-435 apenas em condições específicas (Figura 20).

No caso da isoforma β , não verificamos alterações significativas na área celular média dos dois clones com diminuição de sua expressão em nenhuma das condições avaliadas, confirmando que esta isoforma não está envolvida na regulação da morfologia das células MDA-MB-435 (Figura 20).

De modo semelhante à isoforma β , em todas as condições estudadas, a área média das células parentais foi similar à das células A23neg, em que a expressão das três isoformas foi silenciada simultaneamente, o que reitera o papel individual das isoformas α e γ na modulação do fenótipo da linhagem MDA-MB-435 (Figura 20).

4.7 Avaliação do impacto da redução da expressão das isoformas de ADAM23 na adesão da linhagem MDA-MB-435

A alteração da morfologia dos clones derivados da linhagem MDA-MB-435 com redução da expressão das isoformas α ou γ de ADAM23 evidencia que estas moléculas exercem papéis importantes na manutenção das propriedades adesivas e/ou de espraiamento desta linhagem tumoral.

A fim de explorar esta hipótese, decidimos investigar inicialmente o efeito da diminuição da expressão de cada isoforma de ADAM23 individualmente na

capacidade de adesão da linhagem MDA-MB-435 em condições padrão de cultivo (i.e., em meio de cultura com 10% de soro fetal e em placas não-sensibilizadas com substrato).

Para tanto, células parentais e seus derivados celulares foram removidas das placas de cultura, ressuspensas e semeadas em condições padrão de cultivo celular e, após duas horas de incubação em estufa a 37°C, verificamos a quantidade de células aderidas em cada placa (Figura 21).

Figura 21 – Avaliação do impacto da redução da expressão das isoformas α , β ou γ do gene ADAM23 na capacidade de adesão das células MDA-MB-435 em condições padrão de cultivo. As células WT e seus derivados clonais com diminuição da expressão de cada isoforma do gene ADAM23 (A8, A10, B2, B5, G25 e G40) ou com silenciamento das três isoformas simultaneamente (A23neg), bem como as células transfectadas com o vetor pAVU6+27 vazio (VV1 e VV2), foram tripsinizadas, ressuspensas e semeadas em placas de cultura, utilizando meio de cultura completo, e incubadas em estufa a 37°C durante duas horas. Após a incubação, as placas foram removidas da estufa e as células não-aderidas foram lavadas. As células aderidas foram fixadas, coradas com

solução de violeta cristal, ressuspensas em solução solubilizante e quantificadas em leitor de ELISA (595nm). Os valores representados no gráfico referem-se à média $\pm$ SEM dos valores de absorbância a 595nm medidos no espectrofotômetro em três experimentos independentes. Os resultados entre os diferentes tipos celulares foram analisados pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, e foram considerados estatisticamente significativos os resultados em que $p < 0.05$ (*) para os dois clones com redução da expressão da mesma isoforma de ADAM23.

Podemos observar na figura 21 que a diminuição da expressão das isoformas do gene ADAM23 individualmente não provocou efeito significativo na capacidade adesiva da linhagem MDA-MB-435 em condições padrão de cultivo. Apesar de constataremos variações na quantidade de células aderidas de alguns clones avaliados, quando comparados às células parentais, as alterações observadas não foram estatisticamente significativas. Além disso, observamos resultados distintos para os dois clones com redução da expressão da mesma isoforma (p.ex., absorbâncias de A8 e A10 iguais a 0.57 ± 0.19 e 0.36 ± 0.05 , respectivamente, sendo WT igual a 0.47 ± 0.1 ; absorbâncias de G25 e G40 iguais a 0.46 ± 0.15 e 0.65 ± 0.27 , respectivamente), demonstrando que não há correlação entre os níveis de expressão das isoformas e as variações nas propriedades adesivas das células.

Estas conclusões foram confirmadas pela observação de variações não-significativas na quantidade de células aderidas dos derivados clonais da linhagem MDA-MB-435 transfectados com o vetor pAVU6+27 vazio, VV1 e VV2 (Figura 21), comprovando que as variações observadas não são decorrentes da diminuição da expressão das isoformas. Diante destes resultados, concluímos que nenhuma das isoformas de ADAM23 está preferencialmente envolvida com a regulação global da capacidade adesiva da linhagem MDA-MB-435 em condições padrão de cultivo.

Em um estudo desenvolvido previamente por nosso grupo, foi demonstrado que a ausência de expressão de ADAM23 (i.e., as três isoformas) aumenta a

capacidade de adesão da linhagem MDA-MB-435 em vitronectina e fibronectina (VERBISCK et al. 2009), componentes da matriz extracelular que consistem nos ligantes preferenciais das integrinas do tipo αV (CLEGG et al. 2003). Neste mesmo trabalho, utilizando anticorpos anti- $\alpha V\beta 3$ e anti- $\alpha V\beta 5$ capazes de bloquear especificamente a atividade destas integrinas, VERBISCK et al. demonstraram que o aumento da afinidade por vitronectina e fibronectina nas células MDA-MB-435 que não expressam ADAM23 é mediado conjuntamente por estas duas integrinas αV .

Tendo em vista estas informações, decidimos avaliar o efeito da redução da expressão de cada isoforma de ADAM23 na capacidade adesiva da linhagem MDA-MB-435 em vitronectina e fibronectina, a fim de verificar se as diferentes isoformas poderiam regular a atividade das integrinas do tipo αV (Figura 22).

Figura 22 – Avaliação do impacto da redução da expressão das isoformas α , β ou γ do gene ADAM23 na capacidade de adesão da linhagem MDA-MB-435 em vitronectina (**A**) e em fibronectina (**B**). As células WT e seus derivados clonais com redução da expressão de cada isoforma do gene ADAM23 (A8, A10, B2, B5, G25 e G40) ou das três isoformas simultaneamente (A23neg), juntamente com os clones transfectados com o vetor vazio (VV1 e VV2), foram diluídas em meio de cultura sem soro e semeadas em placas de 96 poços previamente sensibilizadas com vitronectina (1.25 μ g/ml) ou fibronectina (2.5 μ g/ml) e incubadas em estufa a 37°C durante duas horas para permitir sua adesão. Após a incubação, as placas foram removidas da estufa e as células não-aderidas foram lavadas. As células aderidas foram fixadas, coradas com solução de violeta cristal, ressuspensas em solução solubilizante e quantificadas em leitor de ELISA (595nm). Os valores representados no gráfico referem-se à média $\pm$ SEM dos valores de absorbância medidos no espectrofotômetro para cada condição celular em cada um dos substratos avaliados, em três experimentos independentes. Os resultados entre os diferentes tipos celulares foram analisados pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados em que $p < 0.05$ (*) para os dois clones com redução da expressão da mesma isoforma de ADAM23.

Os resultados dos ensaios de adesão em ligantes de matriz purificados demonstram que a diminuição da expressão individual das isoformas de ADAM23 não alterou significativamente a capacidade adesiva da linhagem MDA-MB-435 em vitronectina e fibronectina (Figura 22).

Em relação a ADAM23 α , observamos variações não-significativas da taxa de adesão de A8 e A10 nos dois substratos avaliados, quando comparados às células parentais. Em vitronectina, verificamos absorvância de 0.49 ± 0.05 e 0.47 ± 0.14 para os clones A8 e A10, respectivamente, resultado muito semelhante ao observado para as células WT (0.53 ± 0.05 , $p > 0.05$, Figura 22A). Já em fibronectina, apesar de constataremos variações maiores da quantidade de células A8 e A10 aderidas (absorvância igual a 0.16 ± 0.04 e 0.18 ± 0.02 , respectivamente), em relação às células WT (0.48 ± 0.11), tais variações não foram estatisticamente significativas ($p > 0.05$, Figura 22B).

No caso dos clones com redução da expressão de ADAM23 β , a quantidade de células aderidas nos dois substratos foi similar às células WT. Em vitronectina, constatamos absorvância igual a 0.61 ± 0.13 e 0.65 ± 0.18 para B2 e B5, respectivamente ($p > 0.05$, Figura 22A); já em fibronectina, verificamos absorvância igual a 0.46 ± 0.17 para B2 e 0.38 ± 0.07 para B5 ($p > 0.05$, Figura 22B).

Considerando os clones com diminuição da expressão da isoforma γ , constatamos variações não-significativas na quantidade de células aderidas nos dois substratos. Em vitronectina, verificamos absorvância igual a 0.86 ± 0.21 e 0.73 ± 0.12 para os clones G25 e G40, respectivamente ($p > 0.05$, Figura 22A). Em fibronectina, constatamos absorvância igual a 0.62 ± 0.17 para G25 e 0.6 ± 0.13 para G40, resultados sem significância estatística, quando comparados às células parentais ($p > 0.05$, Figura 22B).

Variações não-significativas na quantidade de células aderidas em vitronectina e fibronectina também foram verificadas nos clones VV1 e VV2, que expressam o vetor vazio, confirmando que as alterações observadas nas demais amostras consistem apenas em variações clonais e/ou experimentais, e não representam efeitos fenotípicos decorrentes da redução da expressão das isoformas (Figura 22).

Estes resultados demonstram que o silenciamento individual das isoformas α , β ou γ de ADAM23 não altera a capacidade adesiva da linhagem MDA-MB-435 em vitronectina e fibronectina, sugerindo que as isoformas não exerçam funções individuais na modulação da atividade das integrinas $\alpha V\beta 3$ e $\alpha V\beta 5$ nesta linhagem.

Diferentemente de VERBISCK et al. (2009), não observamos aumento significativo da quantidade de células A23neg aderidas em vitronectina e fibronectina (0.89 ± 0.13 e 0.61 ± 0.11 , respectivamente), quando comparadas às células parentais ($p > 0.05$ nos dois substratos, Figura 22). Em seu estudo, VERBISCK et al. verificaram maior diferença entre a capacidade de adesão das células MDA-MB-435 WT e as células com silenciamento completo da expressão de ADAM23 em baixas concentrações de vitronectina e fibronectina, as quais, apesar de serem semelhantes numericamente às concentrações utilizadas em nosso trabalho, não correspondem a concentrações com efeitos iguais nos dois estudos, uma vez que os substratos purificados utilizados em cada trabalho têm origens distintas.

Em nosso estudo, previamente à escolha da melhor concentração de cada substrato para avaliar a capacidade de adesão dos derivados clonais de MDA-MB-435 com diminuição individual da expressão das isoformas de ADAM23, nós avaliamos a capacidade de adesão dos diferentes tipos celulares em concentrações distintas e crescentes de substrato, a fim de construir uma curva de adesão celular

dose-dependente. Durante esta padronização, verificamos que as maiores diferenças entre as células parentais e seus derivados com diminuição da expressão individual das isoformas eram observadas em concentrações de substrato distintas daquelas verificadas para as células A23neg. No caso das células A23neg, resultados similares aos descritos por VERBISCK et al. (2009) foram verificados em concentrações de vitronectina e fibronectina cinco vezes menores do que as concentrações escolhidas para este trabalho (resultados não demonstrados).

4.8 Regulação da capacidade de espraiamento celular (*spreading*) mediada pelas isoformas de ADAM23

Dando continuidade ao estudo do envolvimento das isoformas de ADAM23 no controle da morfologia e da adesão celular da linhagem MDA-MB-435, decidimos investigar o impacto da redução da expressão de cada isoforma na capacidade de espraiamento (*spreading*). Para tal, células parentais MDA-MB-435 e seus derivados celulares em estudo foram ressuspensas em meio de cultura sem soro, semeadas em placas de cultura previamente sensibilizadas com diferentes componentes da matriz extracelular (fibronectina, colágeno I ou matrigel) ou em meio de cultura completo (i.e., com 10% SFB), e incubadas em estufa a 37°C durante cinco horas. Após a incubação, analisamos a área das células em microscópio a fim de verificar se havia diferença na quantidade de células espraiadas entre as diferentes condições celulares (Figura 23).

Vale a pena enfatizar que este experimento difere daquele em que avaliamos a morfologia das células MDA-MB-435 e de seus derivados (Figura 20, item 4.6 de *Resultados*) essencialmente no tempo de incubação das células após o seu

plaqueamento. Neste ensaio, a área celular foi analisada cinco horas após as células terem sido semeadas, período em que o processo de espraiamento da linhagem MDA-MB-435 está em andamento.

Previamente à realização deste experimento, determinamos o tempo de incubação ideal para investigar o espraiamento das células MDA-MB-435 parentais e de seus derivados celulares através da observação da quantidade de células espraiadas em intervalos de tempo crescentes, começando logo após o seu plaqueamento. Desta forma, identificamos o período ideal de incubação das células para comparar a quantidade de células espraiadas de cada tipo celular em estudo, que foi cinco horas.

A

B **C**

Figura 23 - Avaliação do espreiamento celular da linhagem MDA-MB-435 e de seus derivados com redução da expressão das isoformas α , β ou γ do gene ADAM23 em diferentes componentes da matriz extracelular ou em presença de meio de cultura completo. As células MDA-MB-435 WT e seus derivados clonais com redução da expressão da isoforma α (A8 e A10), β (B2 e B5) ou γ (G25 e G40),

bem como o clone com silenciamento das três isoformas de ADAM23 (A23neg), e os clones transfectados com o vetor vazio (VV1 e VV2), foram ressuspensos em meio de cultura sem soro e semeados em placas de cultura previamente tratadas com meio de cultura contendo soro fetal (10%), fibronectina (10µg/ml), colágeno I (10µg/ml) ou matrigel (500µg/ml). Após incubação das células em estufa a 37°C durante cinco horas, a área celular foi analisada em microscópio. **A** – Imagens representativas da linhagem MDA-MB-435 parental (WT) e dos clones VV2, A10, B5, G40 e A23neg, nos diferentes substratos avaliados, coletadas no instante em que foram obtidos os resultados demonstrados nos gráficos em **C** (barra, 100µm). **B** – Imagem representativa de células MDA-MB-435 WT espiadas e em suspensão (i.e., não-espiadas), destacando a diferença entre suas áreas, para efeito de comparação entre elas (barra, 100µm). **C** – Área média das células MDA-MB-435 WT e de seus derivados clonais, quantificada utilizando o programa computacional *Image J*. Estão representados nos gráficos os valores médios $\pm$ SEM das áreas das células (µm²) (n=100) em cada condição avaliada. A diferença entre as células foi analisada empregando-se o teste estatístico ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. (*) p<0.05 e (***) p<0.001, resultados estatisticamente significativos para os dois clones com redução da expressão da mesma isoforma de ADAM23, em relação às células WT.

Podemos observar na figura 23 que a redução da expressão das isoformas α , β ou γ de ADAM23 provocou alterações significativas na capacidade de espiamento da linhagem MDA-MB-435 de modo isoforma-específico. Para uma melhor compreensão dos resultados, é importante mencionar que constatamos que a área média de uma célula parental MDA-MB-435 espiada, cujo fenótipo é do tipo mesenquimal, é aproximadamente 400µm², enquanto a área de uma célula desta linhagem não-espiada (i.e., em suspensão), cuja morfologia é arredondada, é em torno de 200µm² (Figura 23B).

Considerando inicialmente a isoforma α , observamos que a redução de sua expressão diminuiu significativamente o espiamento das células MDA-MB-435 em substrato de fibronectina e matrigel, além de em meio de cultura com soro fetal, mas não em colágeno I (Figura 23). Em fibronectina, a área celular média dos clones A8 e A10 constatada foi igual a 293 $\pm$ 8µm² e 277 $\pm$ 8µm², respectivamente, enquanto nas células parentais, verificamos área média igual a 393 $\pm$ 10µm² (p<0.001, Figura 23C).

Em matrigel, observamos que os dois clones com diminuição da expressão de ADAM23 α apresentaram área média em torno de $260\pm 9\mu\text{m}^2$, valor significativamente inferior ao constatado com as células WT ($389\pm 7\mu\text{m}^2$, $p<0.001$, Figura 23C). Por fim, em meio de cultura contendo soro fetal, verificamos que a área média dos clones A8 e A10 foi igual a $247\pm 6\mu\text{m}^2$ e $231\pm 7\mu\text{m}^2$, respectivamente, enquanto nas células-controle, verificamos área média igual a $350\pm 8\mu\text{m}^2$ ($p<0.001$, Figura 23C).

No caso da isoforma β , verificamos alterações significativas no espraçamento dos dois clones com diminuição de sua expressão apenas em meio de cultura com soro (área média de B2 e B5 igual a $313\pm 7\mu\text{m}^2$ e $265\pm 7\mu\text{m}^2$, respectivamente), quando comparadas às células WT (área média igual a $350\pm 8\mu\text{m}^2$, $p<0.05$) (Figura 23C). Nos três substratos de matriz extracelular estudados, não constatamos diferenças significativas entre a área média das células parentais e a de seus dois derivados com redução da expressão de ADAM23 β , demonstrando que o silenciamento específico desta isoforma não altera a capacidade de espraçamento da linhagem MDA-MB-435 em nenhum destes componentes específicos da matriz extracelular (Figura 23).

Alterações acentuadas e significativas da capacidade de espraçamento da linhagem MDA-MB-435 foram constatadas em seus derivados celulares com redução da expressão de ADAM23 γ em todos os componentes de matriz extracelular e também em meio de cultura com soro fetal, evidenciando que esta isoforma tem papel importante na regulação deste processo (Figura 23).

Inicialmente, considerando as células semeadas em meio de cultura com soro, observamos que a área média dos clones G25 e G40 cinco horas após o seu plaqueamento era igual a $225\pm 6\mu\text{m}^2$, valor muito próximo ao das células não-espraiadas (em torno de $200\mu\text{m}^2$, Figura 23B) e que difere significativamente do

observado para as células parentais (área média igual $350\pm 8\mu\text{m}^2$, $p<0.001$, Figura 23C). Resultados semelhantes foram observados para os dois clones em matrigel (área média de G25 igual a $226\pm 6\mu\text{m}^2$ e de G40 igual $243\pm 6\mu\text{m}^2$, sendo a área média das células WT igual a $389\pm 7\mu\text{m}^2$, $p<0.001$, Figura 23C). Em fibronectina, verificamos que a área média dos clones G25 e G40 era próxima a $270\pm 9\mu\text{m}^2$, sendo a área média das células-controle igual a $393\pm 10\mu\text{m}^2$ ($p<0.001$, Figura 23C). Por fim, apesar de um pouco menos acentuada, também constatamos redução do espraio das células G25 e G40 em colágeno I (área média de G25 igual a $322\pm 10\mu\text{m}^2$ e de G40 igual a $306\pm 9\mu\text{m}^2$, sendo a área média das células WT igual a $420\pm 11\mu\text{m}^2$, $p<0.001$, Figura 23C).

É interessante ressaltar que o impacto da redução da expressão das isoformas α ou γ do gene ADAM23 individualmente na capacidade de espraio da linhagem MDA-MB-435 é distinto do efeito verificado pelo silenciamento das três isoformas simultaneamente. Nas células A23neg, verificamos que não houve alteração significativa na área celular média em nenhuma das condições avaliadas, ou seja, a capacidade de espraio das células A23neg foi semelhante à das células parentais em todos os substratos estudados (Figura 23).

5 DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do padrão de expressão das isoformas de splicing α , β e γ de ADAM23 em tecidos normais e linhagens tumorais

Nos últimos anos, muitos trabalhos têm demonstrado a importância das proteínas ADAMs em inúmeros processos biológicos, como proliferação, adesão e migração, e também em etapas do desenvolvimento, como fertilização, angiogênese e neurogênese. A peculiaridade dos membros desta família reside em sua composição estrutural, em que estão presentes diferentes domínios protéicos, cuja importância funcional para cada uma das ADAMs ainda não foi completamente elucidada. Dentre os multidomínios existentes, distinguem-se os domínios de metaloprotease e de desintegrina, que conferem a esta família de proteínas de superfície a exclusividade de atuarem potencialmente na proteólise e na adesão celular de modo simultâneo.

Apesar de apresentar em sua estrutura todos os domínios canônicos dos membros da família ADAM, a proteína ADAM23 não possui atividade proteolítica (RAWLINGS e BARRETT 1995). Sendo assim, supõe-se que esta molécula esteja envolvida exclusivamente no processo de adesão celular.

O gene ADAM23 humano foi identificado em 1998 (SAGANE et al. 1998); entretanto, apenas em 2004, SUN et al. identificaram dois novos transcritos deste gene, produzidos pelo mecanismo de splicing alternativo. A análise da sequência de nucleotídeos destas variantes revelou que uma delas, ADAM23 β , apresentava estrutura muito semelhante à da ADAM23 α (primeira isoforma identificada), e que a

diferença entre elas estava restrita aos seus domínios transmembranas, codificados por exons distintos e com composição de aminoácidos também distinta. Já a outra isoforma identificada, ADAM23 γ , apesar de apresentar todos os domínios extracelulares conservados em sua estrutura, não apresenta nenhum dos exons que codificam para o domínio transmembrana, sugerindo que, provavelmente, esta isoforma corresponda a uma isoforma secretada ou citoplasmática da proteína ADAM23.

Uma vez que o padrão de expressão das três isoformas de splicing do gene ADAM23 foi estudado por SUN et al. (2004) apenas em cérebro, e que a análise do perfil de expressão de um transcrito em diferentes amostras biológicas pode auxiliar a desvendar sua função, pois fornece pistas dos processos em que ele participa, um dos objetivos iniciais deste trabalho foi avaliar o perfil de expressão das isoformas de splicing α , β e γ do gene ADAM23 em diferentes tecidos normais e linhagens celulares tumorais, a fim de verificar a ocorrência de expressão diferencial entre elas.

Inicialmente, foi necessário gerar ferramentas que possibilitassem alcançar este objetivo. Para tanto, padronizamos reações de amplificação em tempo real para avaliarmos o padrão de expressão de cada isoforma de modo individual e específico. Esta etapa foi muito importante, uma vez que não existem anticorpos comerciais que permitam avaliar especificamente a expressão da proteína codificada por cada uma das isoformas do gene ADAM23.

Além da quantificação da expressão das isoformas em diferentes linhagens tumorais e tecidos normais, esta ferramenta também foi fundamental para a segunda parte deste trabalho, que envolveu a geração e a seleção de derivados celulares da

linhagem MDA-MB-435 com silenciamento específico de cada uma das isoformas para a realização de ensaios funcionais.

Desenhamos iniciadores *forward* na junção dos exons codificados diferencialmente por cada isoforma, a fim de amplificar especificamente o transcrito de interesse. Os iniciadores *reverse* foram posicionados tanto no exon exclusivo de cada transcrito, quanto no exon que codifica o domínio citoplasmático, comum às três variantes. Em seguida, testamos dois conjuntos de iniciadores para amplificar cada uma das isoformas.

Após a escolha do melhor par de iniciadores e da concentração ótima para as reações de amplificação em tempo real, avaliamos sua especificidade de amplificação através do sequenciamento do produto amplificado por cada um deles e também por amplificação cruzada de fragmentos purificados das outras duas isoformas. Constatamos que os três pares de iniciadores selecionados eram 100% específicos para suas isoformas-alvo.

Além das reações de amplificação das isoformas de ADAM23, também padronizamos as reações de amplificação de dois genes endógenos, HMBS e PUM1, utilizados como normalizadores. Estes genes foram escolhidos por terem apresentado o nível de expressão mais semelhante ao das isoformas, que são pouco expressas (especialmente a isoforma β), e por serem os mais estáveis em nosso conjunto de amostras, dentre os diversos normalizadores avaliados. Optamos por utilizar controles endógenos em nossa análise com o intuito de eliminar o efeito de variações na quantidade e na qualidade do cDNA nas diferentes amostras, nas análises de expressão gênica por amplificação em tempo real.

Para a avaliação do padrão de expressão das isoformas α , β e γ de ADAM23 em linhagens tumorais e tecidos normais, decidimos empregar a técnica de

quantificação absoluta. Nesta metodologia, o número de cópias do transcrito de interesse é determinado na amostra através da comparação com uma curva-padrão construída com quantidades conhecidas do transcrito-alvo, o que possibilita a comparação dos níveis de expressão de diferentes transcritos dentro de uma amostra e também entre as amostras.

A construção da curva-padrão é uma etapa de extrema importância para o sucesso da quantificação absoluta e diferentes estratégias podem ser empregadas. Dentre as mais amplamente utilizadas, estão a clonagem dos fragmentos de interesse em plasmídeos e o uso de produtos amplificados purificados.

Alguns trabalhos demonstram que diferentes transcritos clonados em vetores plasmidiais podem apresentar diferenças em sua eficiência de amplificação em decorrência de contaminantes na preparação de cada plasmídeo, o que pode interferir não só na amplificação do fragmento de interesse, como também na medida da concentração deste produto. Este efeito pode ser facilmente detectado quando o número de cópias iguais de diferentes produtos não amplifica no mesmo valor de C_T na reação de amplificação em tempo real. Por outro lado, outros estudos comprovam que o uso de produtos de PCR purificados e quantificados por método fluorimétrico é capaz de gerar curvas-padrão com grande acurácia e confiabilidade (VANDENBROUCKE et al. 2001, 2002; WANG et al. 2006).

Considerando estas informações, decidimos construir as curvas-padrão utilizando produtos amplificados e purificados das três variantes do gene ADAM23 e dos controles endógenos HMBS e PUM1, obtidos a partir da re-amplificação dos mesmos fragmentos previamente clonados e sequenciados, para confirmação de sua sequência correta.

Para determinar exatamente o número de cópias de cada transcrito que seria empregado nos pontos conhecidos da curva, os produtos de amplificação foram quantificados em fluorímetro utilizando um reagente fluorescente de alta sensibilidade e específico para moléculas de DNA dupla-fita, o que aumenta significativamente a acurácia da quantificação.

Após todas estas etapas, obtivemos curvas-padrão com alta reprodutibilidade, em que quantidades iguais e conhecidas de transcritos distintos amplificaram em C_T s muito semelhantes, comprovando que o número de cópias de cada fragmento utilizado nos pontos da curva era similar. Além disso, verificamos um alto coeficiente de correlação linear em todas as curvas ($R^2 > 0.995$) e também que a eficiência de amplificação de todos os fragmentos era próxima a 100%.

Uma vez obtidas as ferramentas necessárias para uma análise precisa, específica e reprodutível do nível de expressão de cada variante do gene ADAM23 individualmente, passamos às reações de amplificação nas amostras de cinco tecidos normais e doze linhagens celulares tumorais.

Verificamos que há expressão diferencial entre as isoformas α , β e γ de ADAM23 nos cinco tecidos normais avaliados. Em mama, cólon, próstata e pâncreas, a isoforma γ é a mais expressa. ADAM23 α tem expressão ligeiramente maior do que a isoforma β em tecido normal de mama e próstata, sendo que estas duas isoformas são expressas em níveis semelhantes em pâncreas. Já em cólon, a segunda isoforma mais expressa é ADAM23 β . Diferentemente dos demais tecidos normais estudados, em cérebro constatamos que a isoforma α tem a maior expressão, seguida por ADAM23 γ , cuja expressão é apenas um pouco maior do que a da isoforma β . Estes resultados sugerem que cada isoforma de ADAM23 exerça papéis biológicos distintos, relacionados com a fisiologia dos diferentes tecidos.

O splicing alternativo de precursores do RNA mensageiro maduro (pré-mRNA) é um mecanismo ubíquo e extremamente flexível de controle da expressão gênica em humanos. Estudos recentes baseados no sequenciamento do transcriptoma humano estimam que aproximadamente 90% dos genes humanos sofrem splicing alternativo. Por meio deste mecanismo, um único gene é capaz de produzir diversas isoformas de mRNAs e proteínas que podem exibir propriedades estruturais e/ou funcionais relacionadas, distintas ou, até mesmo, opostas (WANG et al. 2008; KALSOTRA e COOPER 2011).

Apesar de ser amplamente utilizado para aumentar a diversificação dos produtos de um gene, ainda é difícil estimar a fração destes produtos alternativos que realmente exercem algum impacto biológico.

Alguns trabalhos demonstraram que diferentes isoformas de um gene podem ser expressas de modo tecido-específicas e até se localizarem em diferentes compartimentos da célula. Além disso, o perfil de mRNAs expressos em um determinado tecido pode ser alterado durante diversos momentos de transição fisiológica, por exemplo, ao longo do desenvolvimento de um tecido embrionário, em resposta a estímulos externos (p.ex., a ativação de células do sistema imune), em resposta a estresse causados por condições adversas (p.ex., hipóxia), ou em decorrência do surgimento de uma patologia, como o câncer (WANG et al. 2008; DAVID e MANLEY 2010; KALSOTRA e COOPER 2011).

Diante destas informações, não nos surpreende a ocorrência de splicing alternativo no gene ADAM23, principalmente porque sabemos que outros genes ADAMs humanos também sofrem splicing, como ADAM9, 11, 12, 15, 19, 28 e 33. Entretanto, a ocorrência de expressão diferencial entre as isoformas de ADAM23 em tecidos normais distintos é intrigante, de modo que são necessários estudos futuros

capazes de investigar a importância biológica de cada uma delas para os diferentes tipos celulares.

Ao avaliar o perfil de expressão das isoformas α , β e γ de ADAM23 em linhagens tumorais, constatamos que a expressão diferencial verificada nos tecidos normais se mantinha nas doze linhagens tumorais estudadas, e que em todas elas a isoforma γ foi a mais expressa, seguida pela isoforma α , sendo ADAM23 β a menos expressa. Este padrão de expressão das isoformas observado nas linhagens tumorais também foi constatado em tecido normal de mama e próstata; porém, em tecido normal de cólon, cérebro e pâncreas, ele foi distinto.

Verificamos também que a fração que cada isoforma representa em relação ao total de transcritos do gene ADAM23 variou significativamente tanto entre as linhagens tumorais, quanto ao compará-las com seus respectivos tecidos normais. Vale a pena ressaltar que em todas as linhagens tumorais estudadas, a fração representada pela isoforma γ foi a maior, seguida pela isoforma α e, por fim, pela isoforma β .

As alterações observadas no perfil de expressão e na fração que cada uma das isoformas representa em relação à expressão total do gene ADAM23, quando comparamos tecidos normais e linhagens tumorais, sugerem que as isoformas possam ter papéis distintos na tumorigênese e que a regulação de seus níveis de expressão está alterada nas linhagens tumorais.

É importante destacar que a isoforma γ , que provavelmente consiste em uma variante secretada ou citoplasmática do gene ADAM23, foi a isoforma que apresentou expressão mais abundante em todas as amostras avaliadas (exceto cérebro normal), o que evidencia a importância desta molécula nos processos celulares e também na tumorigênese. Entretanto, excetuando-se o presente

trabalho, até o momento não há nenhuma informação sobre a regulação de sua expressão ou acerca de sua função biológica.

Cada ponto de regulação da expressão gênica, o que inclui, por exemplo, o splicing alternativo de precursores de mRNA, a tradução e a estabilidade do mRNA e da proteína, sofre profundas modificações durante o desenvolvimento tumoral (VENABLES 2006; SILVERA et al. 2010). Estudos genômicos demonstraram a ocorrência de alterações em larga escala no processo de splicing durante a tumorigênese (VENABLES 2009). A plasticidade oferecida pelo mecanismo de splicing alternativo para remodelar o proteoma confere às células tumorais a oportunidade de subverter o conjunto de moléculas que são produzidas nas células, de modo a suprir as necessidades de crescimento e disseminação do tumor. De fato, na literatura existem evidências de que todas as áreas da biologia do tumor são afetadas por mudanças provocadas no padrão de splicing alternativo, como metabolismo, apoptose, controle do ciclo celular, invasão e metástase (VENABLES 2004; GHIGNA et al. 2008; DAVID e MANLEY 2010).

Neste sentido, alguns trabalhos da literatura têm investigado se variantes de splicing de membros da família ADAM já relacionados ao câncer exercem funções distintas na progressão tumoral. MAZZOCA et al. (2005) demonstraram que o aumento da expressão de uma isoforma secretada de ADAM9 (ADAM9s) em carcinomas de cólon se correlaciona com o incremento da capacidade invasiva tumoral e maior potencial metastático. Neste trabalho, foi demonstrado que a proteína ADAM9 é secretada por miofibroblastos do estroma hepático, e se liga diretamente às integrinas $\alpha 6\beta 4$ e $\alpha 2\beta 1$ expostas na superfície das células de carcinoma de cólon através de seu domínio desintegrina. Ao ligar-se às integrinas, ADAM9 tem sua atividade proteolítica ativada, tornando-se capaz de clivar laminina,

o que aumenta a capacidade de invasão do tumor e a formação de metástases no fígado.

ZHONG et al. (2008) demonstraram que quatro isoformas de ADAM15 que se diferenciam apenas em suas porções citoplasmáticas são diferencialmente expressas em carcinoma de mama, quando comparadas ao seu padrão de expressão no tecido normal, e verificaram que cada variante se associa a diferentes proteínas sinalizadoras intracelulares, entre elas, Src tirosina-quinase, Brk (tirosina-quinase de tumor de mama) e a proteína adaptadora Nck. Neste estudo, constatou-se que cada isoforma exerce papéis distintos nos processos de adesão celular e invasão. Por fim, o aumento da expressão de uma das variantes de ADAM15 em carcinoma de mama foi correlacionado com o aumento da agressividade do tumor.

Uma vez constatado que o perfil de expressão das isoformas do gene ADAM23 está alterado em linhagens celulares tumorais e, considerando que o envolvimento de ADAM23 com a progressão tumoral já foi comprovado, decidimos estudar a função biológica de cada uma das suas isoformas separadamente e analisar seu papel na carcinogênese.

5.2 Produção de derivados celulares da linhagem tumoral MDA-MB-435 com diminuição da expressão das isoforma α , β ou γ do gene ADAM23 individualmente

A estratégia escolhida para atingir o segundo objetivo principal deste estudo foi o silenciamento da expressão de cada isoforma por interferência de RNA (RNAi) na linhagem tumoral de mama MDA-MB-435. Uma vez que não encontramos sequências previamente testadas e validadas para o silenciamento específico de

cada uma das isoformas de ADAM23, desenhamos manualmente duas sequências para cada isoforma.

A fim de escolher rapidamente qual era a melhor sequência para diminuir a expressão de cada uma das isoformas, utilizamos inicialmente duplexes sintéticos de RNAi e analisamos seu efeito. Observamos que as duas sequências testadas para cada isoforma tiveram efeitos distintos na expressão de seus transcritos-alvo. A partir dos resultados obtidos, selecionamos as sequências capazes de inibir com maior eficiência e especificidade a expressão de cada isoforma do gene ADAM23 (RNAi α 1, β 2 e γ 1).

Em seguida, passamos ao silenciamento estável de cada variante, o que nos possibilitou a realização de experimentos mais longos, que eram de interesse deste estudo. Para tanto, as sequências de RNAi selecionadas foram clonadas no vetor pAVU6+27 para formação de shRNAs isoforma-específicos.

Primeiramente, transfectamos as células MDA-MB-435 com os plasmídeos recombinantes e avaliamos seu efeito na população expressando estavelmente os shRNAs. Apesar de observarmos diminuição da expressão de suas isoformas-alvo, o efeito dos shRNAs na população transfectada foi menor do que o esperado.

Sendo assim, decidimos isolar clones de cada população, com o intuito de obter células expressando o shRNA mais homogeneamente do que a população de origem, visando a obtenção de derivados clonais com maior diminuição da expressão do transcrito de interesse.

Constatamos grande variabilidade na diminuição da expressão da isoforma-alvo do RNAi nos diferentes clones isolados a partir das populações MDA-MB-435 expressando estavelmente shRNA α , β ou γ . A partir de uma análise detalhada dos clones obtidos, selecionamos aqueles que apresentaram os maiores níveis de

diminuição da expressão de cada uma das isoformas, além de estabilidade e especificidade absoluta no efeito do RNAi, para prosseguir o trabalho. Optamos por trabalhar com dois clones com diminuição da expressão de cada isoforma, a fim de discriminarmos entre as alterações fenotípicas decorrentes de cada isoforma das meras variações clonais.

Paralelamente à praticidade da metodologia de RNAi para o silenciamento de genes de interesse, o que possibilita a análise das alterações celulares decorrentes do silenciamento e o estudo da função biológica do gene silenciado, a especificidade de seus alvos deve ser cautelosamente avaliada, a fim de se detectar a existência de efeitos *off-target*, que comprometem todo o restante do trabalho. Em nosso estudo, avaliamos a especificidade dos shRNAs nos clones selecionados através da análise da expressão das outras duas isoformas não-alvo do RNAi, para confirmar que cada shRNA estava interferindo apenas na expressão da isoforma de interesse. Deste modo, utilizamos nos ensaios funcionais subsequentes clones em que comprovamos efeito 100% específico do shRNA para sua isoforma-alvo, sem nenhuma interferência na expressão das demais isoformas.

Embora, num primeiro momento, o efeito final dos shRNAs α , β ou γ na expressão de suas isoformas-alvo pareça ter intensidades bastante distintas, segundo a isoforma considerada, o emprego da técnica de quantificação absoluta da expressão gênica e uma análise minuciosa dos resultados demonstra que isto não ocorre.

O nível de diminuição da expressão de cada um dos transcritos, relativo à sua expressão na linhagem parental, está diretamente associado à quantidade de cópias do transcrito expressas nas células-controle. Ou seja, no caso de ADAM23 γ , que consiste na isoforma mais expressa na linhagem MDA-MB-435 (aproximadamente

1250 cópias), verificamos a existência de aproximadamente 30 e 55 cópias de seus transcritos nos clones G5 e G11, respectivamente, o que representa uma diminuição relativa à sua expressão nas células-controle de 40 e 25 vezes (estes clones passaram a ser denominados G40 e G25).

Já para a isoforma β , cujo número de cópias na linhagem MDA-MB-435 WT é extremamente pequeno (em torno de 30 cópias), a redução de 5 e 2 vezes de seus níveis de expressão nos clones B3 e B8, relativos às células parentais, apesar de parecer pouco significativa à primeira vista, reflete a existência de apenas 6 e 15 cópias de seus transcritos nestes clones, respectivamente, de modo que este nível de diminuição pode ser considerado satisfatório para ADAM23 β (os clones B3 e B8 passaram a ser denominados B5 e B2, respectivamente).

Por fim, a isoforma α , expressa em níveis intermediários nas células parentais (cerca de 290 cópias), teve sua expressão diminuída para aproximadamente 40 e 30 cópias nos clones A8 e A10, respectivamente, o que consiste em 8 e 10 vezes menos transcritos ADAM23 α nestes clones do que nas células-controle. Vale a pena destacar que o efeito final dos shRNAs α e γ na linhagem MDA-MB-435 foi muito semelhante, isto é, o número de cópias final detectado nos clones que expressam estavelmente estes shRNAs foi similar (em torno de 30-50 cópias).

Além de avaliar o efeito dos shRNAs α , β e γ nos derivados celulares de MDA-MB-435 com diminuição da expressão de cada isoforma cultivados em 2-D, ou seja, em monocamada, também analisamos seu impacto nas células cultivadas em modelo tridimensional. Para tanto, produzimos esferóides multicelulares por agregação espontânea das células MDA-MB-435 *in vitro*, utilizando células de cada um dos clones com diminuição da expressão das isoformas de ADAM23.

O cultivo celular em condições tridimensionais possibilita um maior número de interações entre as células vizinhas e células-matriz extracelular, tornando-o mais semelhante às condições fisiológicas *in vivo* do que a cultura em 2-D. Apesar de não mimetizar todas as propriedades mecânicas e geométricas do tecido *in vivo*, muito menos a organização estrutural do mesmo, a qual possibilita a comunicação intercelular e estabelece uma complexidade não só arquitetônica, como também bioquímica, a cultura das células em sistema 3-D recapitula boa parte das interações célula-célula e célula-matriz extracelular, propiciando a deflagração de vias de sinalização dependentes destas interações, o que a torna um modelo mais adequado para o estudo dos processos biológicos (BIRGERSDOTTER et al. 2005; YAMADA e CUKIERMAN 2007).

Em nosso estudo, constatamos diferenças entre os níveis de expressão das isoformas de ADAM23 nas células MDA-MB-435 WT cultivadas em condições 2-D ou 3-D, e também no efeito dos shRNAs em seus derivados celulares.

Nas células MDA-MB-435 parentais cultivadas em sistema tridimensional, observamos um aumento de aproximadamente 1.6 vezes na expressão absoluta do gene ADAM23 (considerando as três isoformas), quando comparamos com sua expressão nas células em monocamada. Em relação aos derivados clonais expressando shRNA α , β ou γ , verificamos uma diminuição do silenciamento nos esferóides formados pelos clones A8, G25 e G40, enquanto naqueles formados pelos clones A10, B2 e B5, o impacto do RNAi foi igual nos dois modelos de cultivo.

Alguns trabalhos que compararam a expressão gênica de células cultivadas em condições 2-D versus 3-D revelaram que muitos genes têm sua expressão modulada diferencialmente entre os dois sistemas de cultivo, com destaque especial àqueles funcionalmente relacionados com interações célula-célula e célula-matriz

extracelular, e com a modulação do citoesqueleto, o que reflete diretamente na adesão, na morfologia e na mobilidade das células mantidas nestas duas condições (BIRGERSDOTTER et al. 2005; YAMADA e CUKIERMAN 2007).

Utilizando a tecnologia de *microarray*, GOSH et al. (2005) compararam o perfil de expressão gênica de células de melanoma mantidas em condições de cultivo 2-D versus 3-D. Dentre os 20.000 genes avaliados, foi observado um aumento de mais de 3 vezes da expressão de 106 genes e uma diminuição da expressão de 73 genes nas células cultivadas em 3-D, em relação às células em monocamada. Dentre os genes *up* regulados nas células cultivadas em modelo tridimensional, destacou-se um incremento acentuado da expressão de diversas quimiocinas (p.ex., CXCL1, CXCL2, CXCL3, IL-8 e CCL20), moléculas de adesão e genes que codificam fatores pró-angiogênicos, os quais estão comprovadamente relacionados com a progressão de melanomas e a formação de metástases. Curiosamente, entre os genes *down* regulados, foram encontrados a integrina $\beta 4$ e FGF-2 (fator de crescimento de fibroblasto 2).

De modo similar, JEANES et al. (2011) empregaram *microarray* para comparar a expressão gênica de células MDCK (do inglês, *Madin–Darby canine kidney cells*) cultivadas em sistema 2-D versus 3-D. A mudança do sistema de cultura de células MDCK resultou em uma alteração dos níveis de expressão de 118 genes dos 23.000 genes analisados. Parte destes genes foram representados por caderinas e outras proteínas componentes dos complexos de adesão célula-célula, enquanto em outra parte dos genes, foram encontradas proteínas das vias de Rab, Rho e Rac.

Nossos resultados demonstraram que os níveis de expressão das isoformas do gene ADAM23 estão aumentados nas células tumorais de mama MDA-MB-435

cultivadas em sistema tridimensional, no qual as interações célula-célula são otimizadas, quando comparado ao cultivo em 2-D. Somados às observações de GOLDSMITH et al. (2004), que demonstraram que ADAM23 parece estar concentrada em sítios de contato intercelular, nossos dados de expressão diferencial sugerem que as isoformas de ADAM23 possam fazer parte de um sistema de moléculas que medeiam interações célula-célula e/ou sinalizem para o controle do citoesqueleto.

5.3 A redução da expressão da isoforma γ do gene ADAM23 aumenta a taxa de proliferação das células MDA-MB-435 cultivadas em modelo tridimensional *in vitro*

O primeiro efeito biológico que investigamos nos derivados celulares da linhagem MDA-MB-435 com diminuição da expressão de cada isoforma do gene ADAM23 foi o impacto sobre a capacidade proliferativa das células. Não verificamos diferenças entre a cinética de proliferação das células MDA-MB-435 WT e de seus derivados clonais cultivados em monocamada, demonstrando que a redução da expressão individual das isoformas de ADAM23 não interfere na proliferação da linhagem MDA-MB-435 em condições 2-D de cultivo.

Entretanto, observamos que a redução da expressão da isoforma γ individualmente provocou um incremento significativo na taxa de incorporação de BrdU no DNA das células MDA-MB-435 cultivadas em sistema tridimensional (329 ± 14 e 330 ± 17 células G25 e G40 BrdU-positivas, respectivamente, versus 257 ± 6 células WT, $p < 0.001$), sugerindo que a diminuição de ADAM23 γ seja capaz de induzir um ganho proliferativo nas células MDA-MB-435 em condições 3-D. A

diminuição da expressão das isoformas α ou β não alterou significativamente a quantidade de células MDA-MB-435 que incorporaram BrdU em seu DNA durante as seis horas de incubação, demonstrando que elas não participam isoladamente deste processo.

Como já mencionado, a proliferação celular é modulada pelo contato célula-célula, uma vez que moléculas que participam do controle da adesão e da proliferação celular estão intimamente relacionadas, como integrinas e fatores de crescimento (WEAVER et al. 1997; WANG et al. 1998; LIU et al. 2004). O sistema de cultivo tridimensional possibilita que as células estabeleçam um maior número de pontos de contato entre si, aproximando-se da estrutura *in vivo*, e, por isso, muitos efeitos dependentes destas interações são observados em condições 3-D, mas não podem ser percebidos quando as células são mantidas em monocamada.

WANG et al. (1998) demonstraram que integrinas do tipo $\beta 1$ e EGFR cooperam na modulação da proliferação de células tumorais de mama em sistema 3-D, através do controle da via de MAPK. Entretanto, a modulação recíproca entre estas moléculas não ocorre quando as células são mantidas em cultivo bidimensional.

Dando continuidade a este estudo, o mesmo grupo demonstrou que o aumento da expressão de PI3K provoca um incremento da capacidade proliferativa de células tumorais de mama, através da ativação de Akt (LIU et al. 2004). Além da proliferação, foi demonstrado que PI3K também participa da regulação de outras vias de sinalização importantes para a aquisição de um fenótipo tumoral mais agressivo em tumor de mama. De modo similar ao estudo anterior, os efeitos de PI3K foram verificados apenas quando as células tumorais foram cultivadas em 3-D, mas não em 2-D.

Nossos resultados sugerem que a redução da expressão da isoforma γ de ADAM23 induz um ganho proliferativo na linhagem tumoral MDA-MB-435. Curiosamente, o impacto do silenciamento completo do gene ADAM23 na taxa de incorporação de BrdU das células MDA-MB-435 cultivadas em esferóides é oposto ao efeito da redução da expressão da isoforma γ . Nas células A23neg, verificamos uma diminuição significativa da quantidade de células marcadas com BrdU (170 ± 2 células BrdU-positivas), quando comparados aos resultados obtidos com as células WT (257 ± 6 células marcadas, $p < 0.001$).

Estes resultados ressaltam a complexidade dos mecanismos que governam os processos biológicos fundamentais, como a proliferação, em que diversas moléculas estão envolvidas, e cujo equilíbrio é modificado nas células tumorais. É possível, por exemplo, que a ausência de atividade de uma proteína seja compensada por outra, impedindo a observação de seu efeito, ou, talvez, que sejam acionadas vias de sinalização distintas daquelas que ocorrem em sua presença. Sendo assim, a escassa quantidade de informações acerca da função das diferentes isoformas de ADAM23 impede a compreensão destes dados nos dias atuais. Contudo, eles certamente contribuirão para que, juntamente com novos estudos, a função destas proteínas e as vias de sinalização das quais elas participam sejam compreendidas nos próximos anos.

5.4 ADAM23 γ : uma proteína fundamental para o controle da morfologia e da capacidade de espraio da linhagem tumoral MDA-MB-435

Uma importante descoberta deste estudo é que ainda não foi atribuída a ADAM23 em nenhum outro relato existente na literatura é a participação da isoforma γ de ADAM23 na regulação da morfologia e da capacidade de espraio da linhagem MDA-MB-435.

Demonstramos neste trabalho que a redução específica da expressão de ADAM23 γ provocou alterações morfológicas significativas na linhagem MDA-MB-435, modificando o fenótipo do tipo mesenquimal característico das células parentais, para um aspecto visivelmente distinto, notadamente arredondado. Este efeito da diminuição da isoforma γ foi verificado tanto em condições padrão de cultivo, em que as células foram cultivadas em placas não-sensibilizadas com substratos e em meio de cultura contendo soro fetal, quanto em componentes específicos da matriz extracelular, como fibronectina, colágeno I e matrigel. Em todas estas condições, a redução de ADAM23 γ reduziu significativamente a área média das células MDA-MB-435, comprovando quantitativamente que a maior parte das células possuía morfologia arredondada. As alterações da morfologia celular provocadas pela diminuição da expressão de ADAM23 γ são permanentes, como comprovado pela morfologia arredondada dos clones G25 e G40, observada durante meses de cultivo celular.

A diminuição da expressão da isoforma γ também reduziu significativamente a capacidade de espraio da linhagem MDA-MB-435 em condições padrão de cultivo e em substratos específicos, como fibronectina, matrigel e colágeno I.

O efeito da redução da expressão de ADAM23 γ na morfologia e na capacidade de espraiamento celular da linhagem MDA-MB-435 sugere que esta molécula possa interferir na organização do citoesqueleto, o qual está diretamente envolvido nestes dois processos celulares. Considerando que a isoforma γ não codifica para um domínio transmembrana em sua sequência de nucleotídeos e que, portanto, pode ser uma proteína secretada ou citoplasmática, podemos formular duas hipóteses distintas.

Primeiramente, caso ADAM23 γ seja uma proteína secretada, é possível que estabeleça interações com moléculas de adesão de superfície celular, capazes de transmitir seus sinais para o meio intracelular e de se comunicar com o citoesqueleto. Entretanto, se ADAM23 γ for uma proteína citoplasmática, podemos supor que ela medeia diretamente a sinalização entre proteínas de membrana e do citoesqueleto.

Em qualquer uma das duas hipóteses, há a participação de proteínas do citoesqueleto e de moléculas de superfície celular, capazes de estabelecer a comunicação entre os meios intra e extracelular, e, em algum ponto desta cascata de sinalização, posiciona-se ADAM23 γ .

Além da ausência de um domínio transmembrana em sua estrutura, as diferenças significativas existentes entre os domínios C-terminal da isoforma γ e as outras duas isoformas de ADAM23 também podem ser responsáveis pelo estabelecimento de interações com parceiros moleculares distintos entre as isoformas. No domínio C-terminal da isoforma γ , são encontrados sete resíduos de serina e um de tirosina, mas não há resíduos de treonina, sendo que estes três tipos de resíduos são potenciais sítios de fosforilação para diversas quinases e, além disso, os resíduos de fosfotirosina resultantes podem atuar como sítios de ligação

para proteínas que contém domínios SH2. Já no caso das isoformas α e β , que apresentam a mesma composição de aminoácidos em seus domínios C-terminais, há apenas um resíduo de treonina e os aminoácidos serina e tirosina estão ausentes.

Os receptores transmembrânicos clássicos, envolvidos com a adesão celular e a transdução de sinal do microambiente extracelular para o citoplasma e vice-versa, são as integrinas. Além de se ligarem a componentes específicos da matriz extracelular, como colágeno, laminina e fibronectina, as integrinas também são capazes de interagir com outras proteínas de superfície, como receptores de tirosina quinases. No meio intracelular, a cauda citoplasmática das integrinas interage com diversas proteínas do citoesqueleto, como α -actinina e talina, as quais podem se ligar diretamente aos filamentos de actina ou interagir com outras proteínas, como vinculina, paxilina e zixina, que, por sua vez, se ligam a tensina e a outras moléculas intracelulares, propagando a sinalização (MIRANTI e BRUGGE 2002).

Muitas moléculas citoplasmáticas sinalizadoras interagem com o citoesqueleto ou com as proteínas a ele associadas, como, por exemplo, FAK (quinase de adesão focal), recrutando proteínas sinalizadoras adicionais. Através desta complexa rede de interações com componentes do citoesqueleto e moléculas sinalizadoras, as integrinas regulam a adesão, o espreadimento e a migração celular, processos que estão intimamente relacionados (MIRANTI e BRUGGE 2002; GUO e GIANCOTTI 2004).

Os microdomínios da membrana plasmática onde estão agrupadas as moléculas que participam da comunicação entre os meios extra e intracelular, incluindo as integrinas, suas proteínas adaptadoras e as extremidades dos filamentos de actina, são denominados pontos de adesão focal. A composição

molecular destes microdomínios de membrana está diretamente relacionada à capacidade celular de aderir, espraiar e migrar. A presença de ligantes específicos, a agregação de integrinas e a polimerização dos filamentos de actina influenciam diferencialmente o recrutamento de proteínas específicas nos pontos de adesão focal (MIYAMOTO et al. 1995; MIRANTI e BRUGGE 2002).

O espraio celular é um processo biológico complexo que envolve diferentes etapas, nas quais há a participação essencial de componentes do citoesqueleto. Primeiramente, células esféricas em suspensão estabelecem contatos iniciais com a matriz extracelular por meio da formação de filopódios, que são projeções cilíndricas e estreitas da membrana plasmática. Em seguida, ocorre um rápido aumento de sua área de contato por meio de protrusões contínuas da membrana plasmática e o surgimento de lamelipódios, expansões membranares amplas e finas. Paralelamente, são formados pontos de adesão focal, que ancoram as células no substrato subjacente. Finalmente, ocorrem contrações celulares periódicas e a formação de filamentos de actina estabilizados, juntamente com o aumento das forças de tração no substrato, nas quais participam principalmente os filamentos de miosina. Estes eventos promovem a maximização da área de espraio antes que as células se tornem polarizadas e adquiram sua morfologia final (DUBIN-THALER et al. 2008).

O agrupamento de integrinas nos pontos de adesão focal em resposta à sua interação com componentes da matriz extracelular, a polimerização dos filamentos de actina e a contração dos filamentos de actinmiosina são eventos necessários para a ativação de FAK, uma proteína-chave na propagação intracelular dos sinais deflagrados pelas integrinas. FAK é capaz de recrutar e de se ligar a proteínas do citoesqueleto, como paxilina e talina, e de desencadear a ativação de muitas outras

cascatas de sinalização intracelulares, incluindo Ras/Erk, Src e PI3K/Akt (MIRANTI e BRUGGE 2002; GUO e GIANCOTTI 2004). As proteínas da família Rho GTPases, destacando-se RhoA, Rac e Cdc42, também são ativadas por FAK e estão diretamente envolvidas na formação dos complexos de adesão focal, dos filopódios e dos lamelipódios, exercendo sua atividade coordenadamente à das integrinas (SCHWARTZ e SHATTIL 2000).

Considerando estas informações e os resultados verificados neste trabalho, é possível que ADAM23 γ esteja envolvida nas redes de sinalização controladas pelas integrinas. Apesar de não termos observado alterações significativas na capacidade de adesão das células MDA-MB-435 com redução de ADAM23 γ em vitronectina e fibronectina, o que consiste em uma forma indireta de avaliar a atividade das integrinas $\alpha V\beta 3$ e $\alpha V\beta 5$, ligantes preferenciais destes substratos, a participação da isoforma γ em vias de sinalização deflagradas pelas integrinas do tipo αV deve ser investigada mais profundamente. De fato, já foi demonstrado que a ativação da integrina $\alpha V\beta 3$ na linhagem MDA-MB-435 é regulada por ADAM23, sem que tenha sido feita a distinção se alguma isoforma ou se as três participam deste processo (VERBISCK et al. 2009).

Somando-se a esta descoberta os resultados já mencionados que comprovaram que a redução da expressão da isoforma γ induz um ganho na capacidade proliferativa da linhagem tumoral MDA-MB-435, podemos especular que ADAM23 γ seja capaz de se ligar a integrinas, ou a outras moléculas diretamente associadas a elas, impedindo seu agrupamento e sua ativação e, desta forma, prevenindo a deflagração de sinais que estimulem a organização do citoesqueleto e ativem a cascata de proliferação celular.

Muitos trabalhos já demonstraram que a formação dos complexos de adesão focal e a organização do citoesqueleto em resposta à interação de integrinas com componentes do meio extracelular também é capaz de regular a proliferação celular. As proteínas FAK e Rho GTPases estão diretamente envolvidas neste processo, pois são capazes de ativar vias de sinalização intracelulares que estimulam a proliferação, como MAPK/Erk (SCHWARTZ e SHATTIL 2000; PROVENZANO e KEELY 2011). Sendo assim, estas moléculas consistem em potenciais parceiros moleculares de ADAM23 γ e a interação entre elas deveria ser investigada.

Na tumorigênese, a diminuição ou ausência de expressão de ADAM23 γ poderia ocasionar a deflagração de vias de sinalização intracelulares que favoreçam o crescimento do tumor em diversas etapas de seu desenvolvimento e contribuam para sua disseminação, uma vez que a morfologia arredondada verificada nas células com diminuição de sua capacidade de espraiamento poderia facilitar, por exemplo, o espalhamento do tumor primário e sua locomoção através da matriz extracelular.

Os dados apresentados na primeira parte deste trabalho demonstraram que a isoforma γ tem níveis de expressão muito mais elevados do que as isoformas α e β do gene ADAM23 nas doze linhagens tumorais avaliadas, sugerindo que a expressão de ADAM23 γ seja frequentemente alta nas células tumorais e que, de algum modo, seja importante para a tumorigênese. Contudo, é importante lembrar que já foi demonstrado que a ausência de ADAM23 favorece a progressão tumoral e se correlaciona com maior potencial metastático (VERBISCK et al. 2009). Portanto, é importante desvendar os mecanismos biológicos e as vias de sinalização nas quais ADAM23 γ está envolvida, a fim de compreender sua importância para a formação e/ou desenvolvimento tumoral.

5.5 A isoforma α de ADAM23 também regula a morfologia e a capacidade de espraio das células MDA-MB-435

Nossos resultados sugerem que ADAM23 α também está envolvida com o controle da morfologia e da capacidade de espraio da linhagem tumoral MDA-MB-435. Verificamos que a diminuição da expressão de ADAM23 α alterou significativamente a morfologia das células MDA-MB-435 em alguns componentes específicos da matriz extracelular (colágeno I e matrigel), mas não em condições padrão de cultivo. De fato, durante os meses em que cultivamos os clones A8 e A10, verificamos que estes clones não apresentavam alterações morfológicas visíveis e permanentes como aquelas observadas nos clones com redução da expressão de ADAM23 γ .

A diminuição da expressão da isoforma α também interferiu negativamente no espraio das células MDA-MB-435 tanto em condições padrão de cultivo, quanto em substrato de fibronectina e matrigel.

Em conjunto, estes resultados demonstram que ADAM23 α também participa da modulação da morfologia celular e da capacidade de espraio das células MDA-MB-435, porém, de modo distinto, ou em intensidades diferentes da isoforma γ . Em todos os experimentos, os efeitos verificados pela redução da expressão de ADAM23 α foram menos intensos do que os da isoforma γ .

Considerando que ADAM23 α é uma proteína transmembrana e que ADAM23 γ é uma proteína secretada ou citoplasmática, estas duas isoformas podem interagir com os mesmos parceiros moleculares, competindo pela ligação entre eles, ou com parceiros distintos, localizados em compartimentos celulares acessíveis a apenas

uma destas isoformas, de modo que estas proteínas poderiam modular diferentemente os mesmo processos biológicos.

A avaliação do padrão de expressão das isoformas de ADAM23 em tecidos normais e linhagens tumorais demonstrou que o nível de expressão de ADAM23 α foi alterado em todas as linhagens tumorais estudadas, quando comparadas aos seus tecidos normais correspondentes, e a fração que a expressão desta isoforma representa em relação à expressão total do gene ADAM23 também se modificou nas linhagens. Em todas as linhagens tumorais, os níveis de expressão de ADAM23 α foram superiores aos níveis de expressão da isoforma β e inferiores aos níveis de expressão da isoforma γ , sugerindo que a isoforma α também possa estar envolvida na tumorigênese.

Somados aos resultados dos ensaios funcionais, estas informações sugerem que, de modo similar a ADAM23 γ , a isoforma α também seja importante para a formação e/ou o desenvolvimento tumoral. Sendo assim, é necessário aprofundar o estudo do papel funcional desta molécula em mecanismos biológicos.

5.6 ADAM23 β exerce funções biológicas distintas das isoformas α e γ , e que permanecem obscuras

Diferentemente dos derivados celulares da linhagem MDA-MB-435 com diminuição da expressão das isoformas α ou γ , não observamos alterações morfológicas visíveis ou diferenças significativas na área média nas células com redução da expressão de ADAM23 β em condições padrão de cultivo ou em diferentes componentes da matriz extracelular.

O único efeito significativo decorrente da diminuição específica da isoforma β na linhagem MDA-MB-435 verificado em nosso estudo foi sobre sua capacidade de espraio em soro fetal (área média de B2 e B5 igual a $313 \pm 7 \mu\text{m}^2$ e $265 \pm 7 \mu\text{m}^2$, respectivamente, versus $350 \pm 8 \mu\text{m}^2$ nas células WT, $p < 0.05$). Nos componentes de matriz extracelular avaliados, a capacidade de espraio das células MDA-MB-435 não foi alterada pela diminuição da expressão da isoforma β .

A isoforma β de ADAM23 também codifica para um domínio transmembrana em sua estrutura; porém, há apenas 54% de similaridade entre a sequência de aminoácidos de seu domínio transmembrana e o da isoforma α . Em decorrência desta diversidade transmembrana entre as duas isoformas, é possível que elas estejam localizadas em subdomínios distintos da membrana celular e, sendo assim, possuam diferentes parceiros moleculares e exerçam papéis biológicos distintos.

De fato, os resultados deste estudo demonstram que, enquanto a diminuição da expressão de ADAM23 α interfere na capacidade de espraio da linhagem MDA-MB-435 em condições padrão de cultivo e em diferentes substratos específicos, como fibronectina, colágeno e matrigel, os efeitos da redução da isoforma β foram restritos ao início do espraio celular em condições padrão de cultivo, ressaltando a diferença funcional entre estas duas isoformas.

É importante lembrar que a isoforma β tem expressão muito baixa em tecidos normais e em linhagens tumorais. ADAM23 β é a isoforma menos expressa em tecido normal de mama, próstata e cérebro, além de em todas as linhagens tumorais avaliadas neste estudo. São necessários estudos futuros que investiguem diferentes processos celulares não abordados neste trabalho, a fim de elucidar o papel biológico de ADAM23 β .

5.7 Últimas considerações e conclusões finais

Neste estudo, demonstramos que as isoformas α , β e γ de ADAM23 são diferencialmente expressas em linhagens tumorais derivadas de cinco tecidos distintos (mama, cólon, cérebro, próstata e pâncreas) e nos tecidos normais correspondentes. Verificamos que o perfil de expressão das isoformas no tecido normal foi alterado nas linhagens tumorais e, em todas elas, a isoforma γ foi a mais expressa, seguida pela isoforma α , sendo a isoforma β a menos expressa.

Ao estudar a função das isoformas de ADAM23 separadamente, observamos que elas exercem papéis biológicos distintos na proliferação, no controle da morfologia celular e no espraiamento da linhagem tumoral de mama MDA-MB-435.

Demonstramos que a diminuição da expressão ADAM23 γ induziu um aumento da capacidade proliferativa em 3-D da linhagem tumoral MDA-MB-435 e diminuiu significativamente a capacidade de espraiamento desta linhagem, tanto em condições padrão de cultivo, quanto em ligantes da matriz extracelular. Estes efeitos foram acompanhados por uma modificação acentuada da morfologia das células MDA-MB-435.

Não foi possível investigar neste trabalho se ADAM23 γ é uma proteína secretada ou citoplasmática, uma vez que não foram disponibilizados até o momento anticorpos comerciais capazes de reconhecer de forma exclusiva esta isoforma de ADAM23. Esta informação é de extrema importância para a continuidade dos estudos acerca de sua função. Entretanto, os resultados demonstrados no presente trabalho comprovam a importância de ADAM23 γ para diferentes processos biológicos.

Paralelamente, demonstramos também que outra variante de ADAM23, a isoforma α , também exerce função importante em alguns dos processos celulares investigados. A redução de sua expressão ocasionou modificações morfológicas na linhagem MDA-MB-435 distintas da isoforma γ . Em conjunto com a redução da capacidade de espraiamento em condições normais e em componentes de matriz extracelular, provocados pela diminuição de sua expressão, nossos resultados sugerem que ADAM23 α , uma proteína ancorada à membrana plasmática, module estes processos de modo diferente ou com intensidade distinta da isoforma γ , provavelmente através da interação com parceiros moleculares específicos.

Em relação a ADAM23 β , uma proteína transmembrana cujos níveis de expressão são os menores dentre as três isoformas deste gene, sua função permanece obscura à luz dos resultados deste trabalho, uma vez que o único efeito fenotípico significativo desta isoforma que conseguimos comprovar foi sobre a capacidade de espraiamento celular em meio de cultura com soro fetal.

Finalmente, a comparação dos efeitos da diminuição da expressão de cada isoforma de ADAM23 individualmente na linhagem MDA-MB-435 com aqueles verificados com o silenciamento completo de ADAM23 revelou resultados distintos nos processos biológicos estudados.

Diferentemente do esperado, não foi possível atribuir a uma isoforma especificamente cada uma das funções de ADAM23 desvendadas anteriormente em nosso laboratório, quando todas as isoformas foram silenciadas simultaneamente, como aumento da adesão e da migração celular, e ativação de integrinas $\alpha V\beta 3$ (VERBISCK et al. 2009). Além disso, os efeitos opostos verificados nos processos biológicos investigados foram surpreendentes e demonstraram a grande complexidade dos mecanismos envolvidos em sua regulação. No futuro, a

descoberta de novos parceiros moleculares para as isoformas de ADAM23 e das vias de sinalização das quais elas participam poderão auxiliar a explicar estes fatos.

6 CONCLUSÕES

- As isoformas α , β e γ do gene ADAM23 são diferencialmente expressas em tecido normal de mama, cólon, cérebro, próstata e pâncreas. A isoforma γ tem o maior nível de expressão em todos os tecidos normais avaliados, exceto por cérebro, em que a isoforma α é a mais expressa.
- Os níveis de expressão das isoformas do gene ADAM23 também são distintos em linhagens tumorais derivadas de diferentes tecidos. Em todas as linhagens tumorais avaliadas, a isoforma γ é a mais expressa, seguida pela isoforma α , e a isoforma β é a menos expressa.
- Em mama e próstata, o padrão de expressão diferencial das isoformas de ADAM23 observado no tecido normal foi mantido nas linhagens tumorais avaliadas; entretanto, a fração representada por cada isoforma em relação à expressão total do gene ADAM23 foi variável entre o tecido normal e as linhagens estudadas, bem como entre as linhagens.
- Em cólon, cérebro e pâncreas, as linhagens tumorais avaliadas apresentaram padrão de expressão das isoformas distinto do tecido normal e a razão relativa a ADAM23 total também foi variável tanto entre o tecido normal e as linhagens, quanto entre as linhagens tumorais estudadas.
- A redução da expressão das isoformas α , β ou γ de ADAM23 não interferiu na taxa de proliferação e no tempo de dobramento de células MDA-MB-435 cultivadas em monocamada (2-D).
- A redução da expressão das isoformas α ou β de ADAM23 não alterou significativamente a taxa de proliferação das células MDA-MB-435 cultivadas em modelo tridimensional.

- A redução da expressão da isoforma γ de ADAM23 aumentou a taxa de proliferação das células MDA-MB-435 cultivadas em modelo tridimensional.
- A redução da expressão das isoformas α , β ou γ de ADAM23 não alterou significativamente a quantidade de colônias formadas em experimentos de clonogênese independente de ancoragem.
- A redução da expressão de ADAM23 γ alterou significativamente a morfologia e a capacidade de espraio das células MDA-MB-435 tanto em condições padrão de cultivo, como também em componentes específicos da matriz extracelular, como fibronectina, colágeno I e matrigel.
- A redução da expressão da isoforma α também alterou significativamente a morfologia e a capacidade de espraio da linhagem MDA-MB-435, porém de modo distinto e/ou com menor intensidade. A diminuição da expressão de ADAM23 α interferiu na morfologia das células MDA-MB-435 em colágeno I e em matrigel, e diminuiu sua capacidade de espraio em condições padrão de cultivo, em fibronectina e em matrigel.
- A redução da expressão de ADAM23 β alterou a capacidade de espraio da linhagem MDA-MB-435 apenas em condições padrão de cultivo; entretanto, esta isoforma não interfere na capacidade de espraio celular nos componentes específicos da matriz extracelular avaliados e também não alterou a morfologia celular em nenhuma das condições avaliadas.
- A redução da expressão das isoformas α , β ou γ de ADAM23 não alterou significativamente a capacidade de adesão da linhagem MDA-MB-435 em condições padrão de cultivo, como também em componentes específicos da matriz extracelular, como vitronectina e fibronectina.

- A redução individual de cada uma das isoformas do gene ADAM23 provocou alterações distintas daquelas verificadas pelo silenciamento completo do gene ADAM23 (i.e., as três isoformas simultaneamente) na proliferação, na morfologia celular e na capacidade de espraiamento da linhagem MDA-MB-435.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albelda, SM, Mette, SA, Elder, DE, et al. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. **Cancer Research** 1990, v. 50, n. 20, p. 6757-6764.

Altschul, SF, Gish, W, Miller, W, et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology** 1990, v. 215, n. 3, p. 403-410.

Arribas, J, Bech-Serra, JJ, Santiago-Josefat, B. ADAMs, cell migration and cancer. **Cancer Metastasis** 2006, v. 25, n. 1, p. 57-68.

Bax, DV, Messent, AJ, Tart, J, et al. Integrin alpha5beta1 and ADAM-17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells. **The Journal of Biological Chemistry** 2004, v. 279, n. 21, p. 22377–22386.

Birgersdotter, A, Sandberg, R, Ernberg, I. Gene expression perturbation in vitro – a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. **Seminars in Cancer Biology** 2005, v. 15, n. 5, p. 405-412.

Black, RA, White, JM. ADAMs: focus on the protease domain. **Current Opinion in Cell Biology** 1998, v. 10, n. 5, p. 654-659.

Blobel, CP, Wolfsberg, TG, Turck, CW, et al. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. **Nature** 1992, v. 356, n. 6366, p. 248-252.

Bode, W, Gomis-Rüth, FX, Stöckler, W. Astacins, serralyins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. **FEBS Letters** 1993, v. 331, n. 1–2, p. 134–140.

Brooks, PC, Clark, RA, Cheresh, DA. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. **Science** 1994, v. 264, n. 5158, p. 569-571.

Brummelkamp, TR, Bernards, R, Agami, R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. **Science** 2002, v. 296, n. 5567, p. 550-553.

Cal, S, Freije, JM, López, JM, et al. ADAM23/MDC3, a Human Disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the $\alpha V\beta 3$ integrin through an RGD-independent mechanism. **Molecular Biology of the Cell** 2000, v. 11, n. 4, p. 1457-1469.

Calmon, MF, Colombo, J, Carvalho, F, et al. Methylation profile of genes CDKN2A (p14 abd p16), DAPKI, CDH1 and ADAM23 in head and neck cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics** 2007, v. 173, n. 1, p. 31-37.

Carreiras, F, Denoux, Y, Staedel, C, et al. Expression and localization of alpha V integrins and their ligand vitronectin in normal ovarian epithelium and in ovarian carcinoma. **Gynecologic Oncology** 1996, v. 62, n. 2, p. 260-270.

Castanotto, D, Rossi, JJ. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. **Nature** 2009, v. 457, n. 7228, p. 426-433.

Choi, JS, Kim, KH, Jeon, YK, et al. Promoter hypermethylation of ADAM23 gene in colorectal cancer cell lines and cancer tissues. **International Journal of Cancer** 2009, v. 124, n. 6, p. 1258-1262.

Clegg, DO, Wingerd, KL, Hikita, ST, Tolhurst, EC. Integrins in the development, function and dysfunction of the nervous system. **Frontiers in Bioscience** 2003, v. 8, p. 723-750.

Cooper, CR, Chay, CH, Pienta, KJ. The role of alpha(v)beta(3) in prostate cancer progression. **Neoplasia** 2002, v. 4, n. 3, p. 191-194.

Costa, FF, Verbisck, NV, Salim, ACM, et al. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. **Oncogene** 2004, v. 23, n. 7, p. 1481-1488.

Costa, FF, Colin, C, Shinjo, SM, et al. ADAM23 methylation and expression analysis in brain tumors. **Neuroscience Letters** 2005, v. 380, n. 3, p. 260-264.

Costa, MD, Paludo, KS, Klassen, G, et al. Characterization of a specific interaction between ADAM23 and cellular prion protein. **Neuroscience Letters** 2009, v. 461, n. 1, p. 16-20.

David, CJ, Manley, JL. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. **Genes & Development** 2010, v. 24, n. 21, p. 2343-2364.

D'Abaco, GM, Ng, K, Paradiso, L, et al. ADAM22, expressed in normal brain but not in high-grade gliomas, inhibits cellular proliferation via the disintegrin domain. **Neurosurgery** 2006, v. 58, n. 1, p. 179-186.

Dubin-Thaler, BJ, Hofman, JM, Cai, Y, et al. Quantification of cell edge velocities and traction forces reveals distinct motility modules during cell spreading. **PloS One** 2008, v. 3, n. 11, e3735.

Dykxhoorn, DM, Novina, CD, Sharp, PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2003, v. 4, n. 6, p. 457-467.

Edwards, DR, Handsley, MM, Pennington, CJ. The ADAM metalloproteinases. **Molecular Aspects of Medicine** 2008, v. 29, n. 5, p. 258-289.

Eto, K, Huet, C, Tarui, T, et al. Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrin alpha9beta1: implications for sperm-egg binding and other cell interactions. **The Journal of Biological Chemistry** 2002, v. 277, n. 20, p. 17804-17810.

Felding-Habermann, B, O'Toole, TE, Smith, JW, et al. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001, v. 98, n. 4, p. 1853-1858.

Fox, JW, Bjarnason, JB. The reprolysins: a family of metalloproteinases defined by snake venom and mammalian metalloproteinases. *In* **Zinc Metalloproteases in Health and Disease**. N. Hooper, editor. Ellis Horwood/Simon & Schuster International Group, West Sussex, England, 1995.

Gaultier, A, Cousin, H, Darribère, T, Alfandari, D. ADAM13 disintegrin and cysteine-rich domains bind to the second heparin-binding domain of fibronectin. **The Journal of Biological Chemistry** 2002, v. 277, n. 26, p. 23336-23344.

Ghigna, C, Valacca, C, Biamonti, G. Alternative splicing and tumor progression. **Current Genomics** 2008, v. 9, n.8, p. 556–570.

Giancotti, FG, Tarone, G. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. **Annual Review of Cell and Developmental Biology** 2003, v. 19, p. 173-206.

Gilpin, BJ, Loechel, F, Mattei, MG, et al. A novel, secreted form of human ADAM12 (meltrin alpha) provokes myogenesis in vivo. **The Journal of Biological Chemistry** 1998, v. 273, n. 1, p. 157-166.

Gingras, MC, Roussel, E, Bruner, JM, et al. Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue. **Journal of Neuroimmunology** 1995, v. 57, n. 1-2, p. 143-153.

Goldsmith, AP, Gossage, SJ, French-Constant, C. ADAM23 is a cell-surface glycoprotein expressed by central nervous system neurons. **Journal of Neuroscience Research** 2004, v. 78, n. 5, p. 647-658.

Gosh, S, Spagnoli, GC, Martin, I, et al. Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: a high density oligonucleotide array study. **Journal of Cellular Physiology** 2005, v. 204, n. 2, p. 522-531.

Guo, W, Giancotti, FG. Integrin signalling during tumor progression. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2004, v. 5, n. 10, p. 816-26.

Hagihara, A, Miyamoto, K, Furuta, J, et al. Identification of 27 5'CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers. **Oncogene** 2004, v. 23, n. 53, p. 8705-8710.

Hirsch, E, Gullberg, D, Balzac, F, et al. Alpha V integrina subunit is predominantly located in nervous tissue and skeletal muscle during mouse development. **Developmental Dynamics** 1994, v. 201, n. 2, p. 108-120.

Hotoda, N, Koike, H, Sasagawa, N, Ishiura, S. A secreted form of human ADAM9 has an alpha-secretase activity for APP. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 2002, v. 293, n. 2, p. 800-805.

Huang, J, Bridges, LC, White, JM. Selective modulation of integrin-mediated cell migration by distinct ADAM family members. **Molecular Biology of the Cell** 2005, v. 16, n. 10, p. 4982-4991.

Hynes, RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell** 2002, v. 110, n. 6, p. 673-687.

Iba, K, Albrechtsen, R, Gilpin, BJ, et al. Cysteine-rich domain of human ADAM12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion. **The American Journal of Pathology** 1999, v. 154, n. 5, p. 1489-1501.

Iba, K, Albrechtsen, R, Gilpin, B, et al. The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading. **The Journal of Cell Biology** 2000, v. 149, n. 5, p. 1143–1156.

Jeanes, AI, Maya-Mendoza, A, Streuli, CH. Cellular microenvironment influences the ability of mammary epithelia to undergo cell cycle. **PLoS One** 2011, v. 6, n. 3, e18144.

Jia, LG, Shimokawa, K, Bjarnason, JB, Fox, JW. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. **Toxicon** 1996, v. 34, n. 11-12, p. 1269-1276.

Kalsotra, A, Cooper, TA. Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. **Nature Reviews Genetics** 2011, v. 12, n. 10, p. 715-729.

Katagiri, T, Harada, Y, Emi, M, Nakamura Y. Human metalloprotease/disintegrin-like (MDC) gene: exon-intron organization and alternative splicing. **Cytogenetics and cell genetics** 1995, v. 68, n. 1-2, p. 39-44.

Kent, WJ. BLAT - The BLAST-Like Alignment Tool. **Genome Research** 2002, v. 12, n. 4, p. 656-664.

Kim, DH, Behlke, MA, Rose, SD, et al. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. **Nature Biotechnology** 2005, v. 23, n. 2, p. 222-226.

Kleinman, HK, Martin, GR. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. **Seminars in Cancer Biology** 2005, v. 15, n. 5, p. 378-386.

Kleino, I, Ortiz, RM, Huovila, AP. ADAM15 gene structure and differential alternative exon use in human tissues. **BMC Molecular Biology** 2007, v. 8, p. 90.

Kleino, I, Ortiz, RM, Yritys, M, et al. Alternative splicing of ADAM15 regulates its interactions with cellular SH3 proteins. **Journal of Cellular Biochemistry** 2009, v. 108, n. 4, p. 877-885.

Krätzschmar, J, Lum, L, Blobel, CP. Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence. **The Journal of Biological Chemistry** 1996, v. 271, n. 9, p. 4593-4596.

Kurisaki, T, Wakatsuki, S, Sehara-Fujisawa, A. Meltrin beta mini, a new ADAM19 isoform lacking metalloprotease and disintegrin domains, induces morphological changes in neuronal cells. **FEBS Letters** 2002, v. 532, n. 3, p. 419-422.

Kveiborg, M, Fröhlich, C, Albrechtsen, R, et al. A role for ADAM12 in breast tumor progression and stromal cell apoptosis. **Cancer Research** 2005, v. 65, n. 11, p. 4754-4761.

Li, L, Price, JE, Fan, D, et al. Correlation of growth capacity of human tumor cells in hard agarose with their in vivo proliferative capacity at specific metastatic sites. **Journal of National Cancer Institute** 1989, v. 81, n. 18, p. 1406-1412.

Liapis, H, Flath, A, Kitazawa, S. Integrin alpha V beta 3 expression by bone-residing breast cancer metastases. **Diagnostic Molecular Pathology** 1996, v. 5, n.2, p. 127-135.

Liu, H, Radisky, DC, Wang, F, Bissell, MJ. Polarity and proliferation are controlled by distinct signaling pathways downstream of PI3-kinase in breast epithelial tumor cells. **The Journal of Cell Biology** 2004, v. 164, n. 4, p. 603-612.

Mazzoca, A, Coppari, R, De Franco, R, et al. A secreted form of ADAM9 promotes carcinoma invasion through tumor-stromal interactions. **Cancer Research** 2005, v. 65, n. 11, p. 4728-4738.

Mitchell, KJ, Pinson, KI, Kelly, OG, et al. Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. **Nature Genetics** 2001, v. 28, n. 3, p. 241-249.

Miranti, CK, Brugge, JS. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. **Nature Cell Biology** 2002, v. 4, n. 4, p. 83-90.

Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, et al. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. **The Journal of Cell Biology** 1995, v. 131, n. 3, p. 791-805.

Mochizuki, S, Okada, Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. **Cancer Science** 2007, v. 98, n. 5, p. 621-628.

Murphy, G. The ADAMs: signaling scissors in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Cancer** 2008, v. 8, n. 12, p. 929-941.

Natali, PG, Hamby, CV, Felding-Habermann, B, et al. Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. **Cancer Research** 1997, v. 57, n. 8, p. 1154-1160.

Niewiarowski, S, McLane, MA, Kloczewiak, M, Stewart, GJ. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Seminars in Hematology** 1994, v. 31, n. 4, p. 289-300.

Novak, U. ADAM proteins in the brain. **Journal of Clinical Neuroscience** 2004, v. 11, n. 3, p. 227-235.

Owuor, K, Harel, NY, Englot, DJ, et al. LGI1-associated epilepsy through altered ADAM23-dependent neuronal morphology. **Molecular and Cellular Neurosciences** 2009, v. 42, n. 4, p. 448-457.

Pfaffl, MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research** 2001, v. 29, n. 9, p. 2002-2007.

Patzel, V. In silico selection of active siRNA. **Drug Discovery Today** 2007, v. 12, n. 3-4, p. 139-148.

Paul, CP, Good, PD, Winer, I, Engelke, DR. Effective expression of small interfering RNA in human cells. **Nature Biotechnology** 2002, v. 20, n. 5, p. 505-508.

Peduto, L, Reuter, VE, Shaffer, DR, et al. Critical function for ADAM9 in mouse prostate cancer. **Cancer Research** 2005, v. 65, n. 20, p. 9312-9319.

Pei, Y, Tuschl, T. On the art of identifying effective and specific siRNAs. **Nature Methods** 2006, v. 3, n. 9, p. 670-676.

Pignatelli, M, Cardillo, MR, Hanby, A, Stamp, GW. Integrins and their accessory adhesion molecules in mammary carcinomas: loss of polarization in poorly differentiated tumors. **Human Pathology** 1992, v. 23, n.10, p. 1159-1166.

Powell, RM, Wicks, J, Holloway, JW, et al. The splicing and fate of ADAM33 transcripts in primary human airways fibroblasts. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology** 2004, v. 31, n. 1, p. 13-21.

Primakoff, P, Myles, DG. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. **Trends in Genetics** 2000, v. 16, n. 2, p. 83-87.

Provenzano, PP, Keely, P.J. Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and Rho GTPases signaling. **Journal of Cell Science** 2011, v. 124, n. 9, p. 1195-1205.

Rawlings, ND, Barrett, AJ. Evolutionary families of metallopeptidases. **Methods in Enzymology** 1995, v. 248, p. 183-228.

Roberts, CM, Tani, PH, Bridges, LC, et al. MDC-L, a novel metalloprotease disintegrin cysteine-rich protein family member expressed by human lymphocytes. **The Journal of Biological Chemistry** 1999, v. 274, n. 41, p. 29251-29259.

Rolli, M, Fransvea, E, Pilch, J, et al. Activated integrin alphavbeta3 cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003, v. 100, n. 16, p. 9482-9487.

Roy R, Wewer, UM, Zurakowski, D, et al. ADAM 12 cleaves extracellular matrix proteins and correlates with cancer status and stage. **The Journal of Biological Chemistry** 2004, v. 279, n. 49, p. 51323-51330.

Sagane, K, Ohya, Y, Hasegawa, Y, Tanaka I. Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MDC2 and MDC3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. **The Biochemical Journal** 1998, v. 334, pt. 1, p. 93-98.

Sagane, K, Yamazaki, K, Mizui, Y, Tanaka, I. Cloning and chromosomal mapping of mouse ADAM11, ADAM22 and ADAM23. **Gene** 1999, v. 236, n. 1, p. 79-86.

Sagane, K, Hayakawa, K, Kai, J, et al. Ataxia and peripheral nerve hypomyelination in ADAM22-deficient mice. **BMC Neuroscience** 2005, v. 6, p. 33.

Sagane, K, Ishihama, Y, Sugimoto, H. LGI1 and LGI4 bind to ADAM22, ADAM23 and ADAM11. **International Journal of Biological Sciences** 2008, v. 4, n. 6, p. 387-396.

Saiga, T, Ohbayashi, T, Tabuchi, K, Midorikawa, O. A model for tumorigenicity and metastatic potential: growth in 1.0% agar cultures. **In Vitro Cellular & Developmental Biology** 1987, v. 23, n. 12, p. 850-854.

Sambrook, J, Russell, DW. Molecular Cloning. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, 2001.

Sanger, F, Nicklen, S, Coulson, AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Nat Acad Sci USA** 1977, v. 74, n. 12, p. 5463-5467.

Schlöndorff, J, Blobel, CP. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. **Journal of Cell Science** 1999, v. 112, pt. 21, p. 3603-3617.

Schwartz, MA, Shattil, SJ. Signaling networks linking integrins and Rho family GTPases. **Trends in Biochemical Sciences** 2000, v. 25, n. 8, p. 388-391.

Seals, DF, Courtneidge, SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes & Development** 2003, v. 17, n. 1, p. 7-30.

Silvera, D, Formenti, SC, Schneider RJ. Translational control in cancer. **Nature Reviews Cancer** 2010, v. 10, n. 4, p. 254–266.

Sun, YP, Deng, KJ, Wang, F, et al. Two novel isoforms of Adam23 expressed in the developmental process of mouse and human brains. **Gene** 2004, v. 325, p. 171-178.

Takada, H, Imoto, I, Tsuda, H, et al. ADAM23, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in gastric cancers by homozygous deletion or aberrant promoter hypermethylation. **Oncogene** 2005, v. 24, n. 54, p. 8051-8060.

Tang, BL, Hong, W. ADAMTS: a novel family of proteases with an ADAM protease domain and trombospondin 1 repeats. **FEBS Letters** 1999, v. 445, n. 2, p. 223-225.

Vandenbroucke I, Vandesompele, J, Paepe, AD, Messiaen, L. Quantification of splice variants using real-time PCR. **Nucleic Acids Research** 2001, v. 29, n. 13, e68-8.

Vandenbroucke, I, Vandesompele, J, De Paepe A, Messiaen, L. Quantification of NF1 transcripts reveals novel highly expressed splice variants. **FEBS Letters** 2002, v. 522, n. 1-3, p. 71-76.

Vandesompele, J, De Preter, K, Pattyn, F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology** 2002, v. 3, n. 7, research0034.

Venables, JP. Aberrant and alternative splicing in cancer. **Cancer Research** 2004, v. 64, n. 21, p. 7647–7654.

Venables, JP. Unbalanced alternative splicing and its significance in cancer. **Bioessays** 2006, v. 28, n. 4, p. 378–386.

Venables, JP, Klinck, R, Koh, C, et al. Cancer-associated regulation of alternative splicing. **Nature Structural & Molecular Biology** 2009, v. 16, n. 6, p. 670–676.

Verbisck, NV, Costa, ET, Costa, FF, et al. ADAM23 negatively modulates alpha(v)beta(3) integrin activation during metastasis. **Cancer Research** 2009, v. 69, n. 13, p. 5546-5552.

Wang, F, Weaver, VM, Petersen, OW, et al. Reciprocal interactions between beta1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998, v. 95, n. 25, p. 14821-14826.

Wang, Y, Zhu, W, Levy, DE. Nuclear and cytoplasmic mRNA quantification by SYBR green based real-time RT-PCR. **Methods** 2006, v. 39, n. 4, p. 356-362.

Wang, ET, Sandberg, R, Luo, S, et al. Alternative isoforma regulation in human tissue transcriptomes. **Nature** 2008, v. 456, n. 7221, p. 470-476.

Weaver, VM, Petersen, OW, Wang, F, et al. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. **The Journal of Cell Biology** 1997, v. 137, n. 1, p. 231-245.

Wild-Bode, C, Fellerer, K, Kugler, J, et al. A basolateral sorting signal directs ADAM10 to adherens junctions and is required for its function in cell migration. **The Journal of Biological Chemistry** 2006, v. 281, n. 33, p. 23824–23829.

Wolfsberg, TG, Straight, PD, Gerena, RL, et al. ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. **Developmental Biology** 1995a, v. 169, n. 1, p. 378-383.

Wolfsberg, TG, Primakoff, P, Myles, DG, White, JM. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. **The Journal of Cell Biology** 1995b, v. 131, n. 2, p. 275-278.

Yamada, KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. **Cell** 2007, v. 130, n. 4, p. 601-610.

Zhong, JL, Poghosyan, Z, Pennington, CJ, et al. Distinct functions of natural ADAM-15 cytoplasmic domain variants in human mammary carcinoma. **Molecular Cancer Research** 2008, v. 6, n. 3, p. 383-394.

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS

Nome: Felicia Peterson Cavalher
Data de nascimento: 24 de fevereiro de 1983
Local de nascimento: Juiz de Fora - MG – Brasil

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

- 2007 - 2012 Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica)**
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: *Caracterização funcional das isoformas de splicing do gene ADAM23*
Orientadora: Anamaria Aranha Camargo
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2005 - 2007 Mestrado em Oncologia**
Fundação Antônio Prudente, FAP, São Paulo, Brasil
Título: *Caracterização do gene ADAM23 como um novo marcador molecular de prognóstico em câncer de mama*
Orientadora: Anamaria Aranha Camargo
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2001 - 2005 Graduação em Ciências Biológicas**
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: *Função das Glutarredoxinas sobre a atividade do Proteassoma 20S: implicações na regulação redox intracelular*
Orientadora: Marilene Demasi
Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- 2010 - 2010** Curso de curta duração em 1st São Paulo School of Translational Science.
Fundação Antônio Prudente, FAP, São Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em ECM, Integrins and Cell Signaling.
Sociedade Brasileira de Biologia Celular, SBBC, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Improving Recombinant Protein Expression in Bact.. Merck Biosciences S. A., MERCK S.A., Brasil, MERCK S.A., Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Treinamento BD FACSCalibur.
BD Biosciences Centro de Treinamento, BD, Brasil

PRÊMIOS

- 2010** EACR-21 Meeting Bursary, European Association for Cancer Research

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. VERBISCK, NV, COSTA, ET, COSTA, FF, **CAVALHER, FP**, COSTA, MDM, MURAS, A, PAIXÃO, VA, MOURA, R, GRANATO, MF, IERARDI, DF, MACHADO, T, MELO, F, RIBEIRO, KB, CUNHA, IW, LIMA, VCC, MACIEL, MS, CARVALHO, AL, SOARES, FA, SOGAYAR, MC, CHAMMAS, R, CAMARGO, AA. ADAM23 negatively modulates α V β 3 integrin activation during metastasis. **Cancer Research** 2009, v. 69, p.5546-5552.
2. COSTA, FF, PAIXÃO, VA, **CAVALHER, FP**, RIBEIRO, KB, CUNHA, IW, RINCK JUNIOR, JA, O'HARE, M, MACKAY, A, SOARES, FA, BRENTANI, RR, CAMARGO, AA. SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics** 2006, v.165, p.135-143.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumos)

1. **CAVALHER, FP**, COSTA, ET, CAMARGO, AA. ADAM23 splicing isoforms: distinct role on the modulation of α V β 3 integrin activity.
In: **21st meeting of the European Association for Cancer Research**, 2010, Oslo - Noruega. European Journal of Cancer Supplements. Oxford: Elsevier, 2010, v.8., p.165.
2. **CAVALHER, FP**, COSTA, ET, CAMARGO, AA. The functional role of ADAM23 splicing isoforms on the modulation of α V β 3 integrin expression and activation.
In: **5th International Conference on Tumor Microenvironment: Progression, Therapy, and Prevention**, 2009, Versailles - França. Cancer Microenvironment. Springer, 2009, v.2. p.S13 -S136.
3. **CAVALHER, FP**, CUNHA, IW, OSORIO, CABT, SOARES, FA, CAMARGO, AA. ADAM23 promoter hypermethylation as a molecular marker to detect metastatic cells in sentinel lymph nodes of breast cancer patients.
In: **VIII São Paulo Research Conferences - Câncer: da Biologia Molecular ao Tratamento**, 2007, São Paulo - SP - Brasil.
4. ONG, TP, CHAGAS, CEA, BASSOLI, BK, CONTI, A, **CAVALHER, FP**, CAMARGO, AA, JORDAO JUNIOR, AA, VANNUCCHI, H, DAGLI, MLZ, MORENO, FS. Alterações no metabolismo da vitamina A em hepatocarcinomas de ratos não envolvem silenciamento epigenético do gene para a proteína ligadora de retinol celular tipo-1 (CRBP-1).
In: **9º. Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição - SBAN**, 2007, São Paulo - SP - Brasil.
5. COSTA, FF, **CAVALHER, FP**, PAIXÃO, VA, GRANATO, MF, IERARDI, DF, CUNHA, IW, RIBEIRO, KB, LIMA, VCC, CARVALHO, AL., MACIEL, MS, SOARES, FA, CAMARGO, AA. ADAM23 promoter hypermethylation as an independent prognostic factor in breast cancer.
In: **XIII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular/ IX Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular/ IV International Symposium on Extracellular Matrix**, 2006, Búzios - RJ - Brasil.
6. COSTA, FF, PAIXÃO, VA, **CAVALHER, FP**, RIBEIRO, KB, CUNHA, IW, RINCK JUNIOR, JA, O'HARE, M, MACKAY, A, SOARES, FA, BRENTANI, RR, CAMARGO, AA. SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer.
In: **IV São Paulo Research Conference - Cancer Today, from molecular biology to treatment**, 2005, São Paulo - SP - Brasil.

7. **CAVALHER, FP**, IERARDI, DF, COSTA, FF, KLASSEN, G, CAMARGO, AA. Expression pattern and methylation analysis of the promoter region of different ADAM family members in breast tumor.

In: **VIII Simpósio Internacional sobre Matriz Extracelular**, 2004, Angra dos Reis - RJ - Brasil.

8. **CAVALHER, FP**, SILVA, GM, DEMASI, M, SOARES NETTO, LE. Função das Glutarredoxinas sobre a atividade do Proteassoma 20S: Implicações na regulação redox intracelular.

In: **XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2003, Caxambu - MG - Brasil.