

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CAMILLA MENDES GONÇALVES

**Análise Funcional do Silenciamento Gênico de Versicam em Células Trofoblásticas e sua  
Implicação em Doenças Gestacionais**

MACEIÓ

2019

CAMILLA MENDES GONÇALVES

**Análise Funcional do Silenciamento Gênico de Versicam em Células Trofoblásticas e sua  
Implicação em Doenças Gestacionais**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Urban Borbely

MACEIÓ

2019

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 - 661

G635a    Gonçalves, Camilla Mendes.

Análise funcional do silenciamento gênico de versicam em células trofoblásticas e sua implicação em doenças gestacionais / Camilla Mendes Gonçalves. – 2019.  
103 f.: il. color.

Orientador: Alexandre Urban Borbely.  
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós- Graduação Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2019.

Inclui bibliografias.

Apêndice: f. 57-58.

1. Silenciamento gênico – Versicam. 2. Placenta. 3. Trofoblasto. 4. Motilidade celular. 5. Doença trofoblástica gestacional. I. Título.

CDU: 618.3



Universidade Federal de Alagoas  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

CBS - UFAL - Campus A. C. Simões  
Avenida Carlos Manoel de Azevedo, 578  
Cidade Universitária - Maceió-AL  
CEP: 57072-900  
E-mail: pccs@ufal.br  
Fone: 82.3214.1880

### Folha de Aprovação

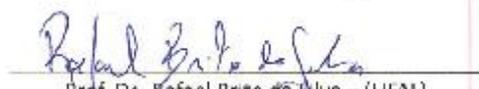
Camilla Mendes Gonçalves

Análise funcional do silenciamento gênico de versicans em células trofoblásticas e sua implicação em doenças gestacionais

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 12 de Julho de 2019.

### Banca Examinadora

  
Prof. Dr. Alexandre Urban Barbely (Orientador)

  
Prof. Dr. Rafael Brito da Silva - (UFAL)

  
Prof.ª Dr.ª Estela Maris Andrade Forelli Bevilacqua - (USP)

*Ao meu filho Benício, meu passarinho.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu filho Benício Nascimento Mendes Gonçalves, por ser o sol da minha vida;

Aos meus pais, Luciana Mendes Gonçalves e Luciano Lourenço Gonçalves, e meu irmão, Leonardo Mendes Gonçalves, por todo amor e apoio em todas as etapas da minha vida. Em especial deixo minha eterna gratidão à minha mãe, quem me ajuda nos momentos mais difíceis;

Ao meu noivo Emanuel Felipe Lins Nascimento, meu companheiro de todas as horas e que sempre me faz feliz;

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Urban Borbely, por todo suporte, apoio e confiança e disponibilidade. Por todo conhecimento compartilhado e incentivo que fez possível a elaboração desse trabalho;

Às integrantes do Grupo de Pesquisa da Saúde da Mulher e Gestação, minhas *trofogirls*, Ana Lúcia Mendes, Eloiza Lopes de Lira Tanabe, Jaqueline Correia Santos, Keyla Silva Nobre Pires, Liliane Patrícia Gonçalves Tenório e Rayane Martins Botelho, por serem tão companheiras na amizade e no trabalho, por todo comprometimento, parceria, apoio e por serem a melhor equipe de trabalho;

À Dr<sup>a</sup>. Karen Steponavicius Cruz Borbely, pela valiosa contribuição para o desenvolvimento desse trabalho;

À banca de qualificação deste trabalho, Dr<sup>a</sup>. Karen Steponavicius Cruz Borbely e Prof. Dr. Lucas Anhezini de Araújo, pelo valoroso auxílio na finalização deste trabalho;

A todos os meus colegas do Laboratório de Biologia Celular por todo conhecimento compartilhado e dias de trabalho cheios de alegria;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Vanessa Morais Freitas e à Ms. Suély Vieira Silva por toda simpatia, apoio e valorosa colaboração para o desenvolvimento deste trabalho;

A todos meus professores, do ensino fundamental à graduação, por me proporcionarem o conhecimento não apenas sistemático, mas a manifestação do caráter no processo de formação profissional. Por toda dedicação, por não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender. A todos, aos quais sem nominar terão os meus eternos agradecimentos;

A todos que não foram aqui citados, mas de alguma maneira me incentivaram, me influenciaram ou de alguma maneira participam ou participaram da minha jornada, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

**Introdução:** O Versicam é um proteoglicano responsável por diversas funções em diferentes células, sendo especialmente regulado em tumores invasivos. As isoformas V0 e V1 de versicam são produzidas apenas por células trofoblásticas invasivas do primeiro trimestre de gestação e de placentas anormalmente invasivas, embora as possíveis funções do versicam ainda permaneçam elusivas. Deste modo, verificar as funções que o versicam possui nessas células é essencial para futuras abordagens em doenças invasivas como a placenta anormalmente invasiva. **Objetivo:** Analisar os efeitos celulares e funcionais do silenciamento gênico de versicam em células trofoblásticas. **Métodos:** Células HTR-8/SVneo derivadas do primeiro trimestre de gestação foram silenciadas para mRNA e proteína de versicam. Foram analisadas morte celular, proliferação, fases do ciclo celular, fosforilação de proteína de adesão focal (FAK) e diferentes parâmetros de motilidade, bem como a produção de citocinas Th1 / Th2. Por fim, a fosforilação da via Rho/ROCK foi verificada. **Resultados:** O silenciamento de versicam foi eficiente, os níveis de mRNA e proteína versicam foram reduzidos ( $p < 0,001$ ). A proliferação foi levemente reduzida e o tempo de fechamento da ferida *in vitro* foi atrasado ( $p < 0,001$ ). A velocidade das células foi analisada através de videomicroscopia *time-lapse* também foi reduzida ( $p < 0,0001$ ), assim como a invasão através de câmaras *transwell* revestidas com fibronectina foi reduzida ( $p < 0,05$ ). A análise de pFAK mostrou diminuição da fosforilação após o silenciamento. Várias citocinas também foram afetadas, com produção reduzida de IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6 e IL-10, enquanto aumentaram a produção de IL-2 e IL-13 ( $p < 0,05$ ). A análise da via Rho/ROCK mostrou diminuição da fosforilação após o silenciamento, confirmando seu envolvimento na sinalização de versicam. **Conclusões:** O versicam mostrou-se uma importante molécula-chave para a regulação positiva da motilidade de células trofoblásticas, e com propriedades relevantes de modulação imune no microambiente da placenta. Portanto, pode ser um alvo farmacológico em futuras terapias com foco na modulação da motilidade do trofoblasto.

**Palavras-chave:** Versicam; Placenta; Trofoblasto; Motilidade.

## ABSTRACT

**Introduction:** Versican is a proteoglycan responsible for several functions in different cells, being especially upregulated in invasive tumors. Versican V0 and V1 isoforms are produced only by invading trophoblast cells from the first trimester of pregnancy and from abnormally invasive placentas, although versican possible functions remains elusive. As such, the verification of versican roles in trophoblast cells is essential to future research on invasive diseases as the abnormally invasive placenta. **Aim:** To analyze cellular and functional effects of versican gene silencing in trophoblast cells. **Methods:** First trimester-derived HTR-8/SVneo cells were silenced for versican and its efficiency tested at both mRNA and protein levels. Cell death, proliferation, cell cycle phases, focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation and different motility parameters, as well as Th1/Th2 cytokines production were analyzed. Lastly, Rho/ROCK signaling pathway phosphorylation was verified. **Results:** Versican silencing was efficient, as versican mRNA and protein levels were utterly reduced ( $p < 0,001$ ). Proliferation was slightly reduced, and *in vitro* wound closure time was greatly delayed ( $p < 0,001$ ). Cell speed was analyzed through time-lapse microscopy and it was also reduced ( $p < 0,0001$ ), as well as the invasion through fibronectin-coated transwell chambers ( $p < 0,05$ ). The analysis of pFAK showed decreased phosphorylation after silencing. Several cytokines were also affected, with reduced production of IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6 and IL-10, while the increased production of IL-2 and IL-13 ( $p < 0,05$ ). The analysis of Rho/ROCK pathway showed decreased phosphorylation after silencing, confirming its involvement in versican signaling. **Conclusions:** Versican proved to be an important key molecule upregulator of trophoblast motility and with relevant immune modulation properties in the placenta microenvironment. Therefore, it could be a pharmacological target in future therapies focusing on the modulation of trophoblast motility.

**Key Words:** Versican; Placenta; Trophoblast; Motility.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Estrutura geral de um proteoglicano da família dos lecticanos .....	23
<b>Figura 2</b> - Isoformas de versicam. ....	26
<b>Figura 3</b> - Via de sinalização Rho-GTP/ROCK .....	37
<b>Figura 4</b> – Interface materno-fetal .....	39
<b>Figura 5</b> - Ação do silenciamento gênico na célula.....	46
<b>Figura 6</b> - Níveis celulares da proteína versicam em HTR-8/SVneo .....	54
<b>Figura 7</b> - Análise da expressão proteica de versicam por citometria de fluxo em HTR-8/SVneo.....	55
<b>Figura 8</b> - Expressão gênica de versicam em HTR-8/SVneo .....	55
<b>Figura 9</b> - Análise da proliferação celular por meio da imunolocalização de Ki-67.....	57
<b>Figura 10</b> - Avaliação da porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular por meio de imunofluorescência para Ki-67 .....	58
<b>Figura 11</b> - Avaliação da secreção de citocinas em células HTR-8/SVneo .....	60
<b>Figura 12</b> - Marcação para faloidina e imunomarcação para pFAK .....	62
<b>Figura 13</b> - Quantificação da imunofluorescência para pFAK.....	63
<b>Figura 14</b> - Ensaio “ <i>scratch</i> ” com células HTR-8/SVneo.....	65
<b>Figura 15</b> - Quantificação do ensaio de migração celular, através da análise de “ <i>scratch</i> ” .....	66
<b>Figura 16</b> - Velocidade celular analisada por videomicroscopia <i>time-lapse</i> .....	66
<b>Figura 17</b> - Ensaio de invasão em fibronectina em câmaras bipartites tipo <i>Transwell</i> em células HTR-8/SVneo .....	67
<b>Figura 18</b> – Avaliação das vias RhoA-GTP/ROCK2 em células HTR-8/SVneo.....	68
<b>Figura 19</b> – Sinalização para silenciamento gênico de versicam em HTR-8/Svneo.....	76

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Localização e principais funções das isoformas de versicam.....	28
<b>Tabela 2</b> – Sequências de <i>primers</i> para mRNA de GAPDH e isoformas de versicam .....	49
<b>Tabela 3</b> - Avaliação de morte celular por marcação de Anexina V / Iodeto de Propídio em células HTR-8/SVneo .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AIP** – Placenta Anormalmente Invasiva

**AKT** – Proteína quinase B

**ASMCs** – Células de músculo liso arterial

**BSA** – Albumina de soro bovino

**CBA** – *Cytometric Beads Array*

**CCL** – Ligante de quimiocina cc

**CD** – Grupamento de diferenciação

**cDNA** – DNA complementar

**CPI-17** – Proteína inibidora potenciada pela proteína quinase C de 17 kDa

**CRIPTO-1** – Fator de crescimento derivado do teratocarcinoma

**CSF** – Fator estimulador de colônias

**CSPG2** – Proteoglicano de sulfato de condroitina 2

**Ct** – Controle

**DAMP** – Padrões moleculares associados ao dano ou perigo

**DMEM/F12** – Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco com mistura de nutrientes F-12

**DNA** – Ácido desoxirribonucléico

**EGF** – Fator de crescimento epidérmico

**EGF-R** – Receptor do fator de crescimento epidérmico

**EMT** – Transição epitélio-mesenquimal

**ErbB2** – Receptor de tirosina quinase 2 ErbB2

**ERM** – Ezrina-radixina-moesina

**ESC** – Células-tronco embrionárias

**EVT** – Citotrofoblasto extraviloso

**FAK** – Quinase de adesão focal

**Fas** – Receptor de sinal de apoptose

**FHOD1** – Homologia de formina 2 contendo domínio 1

**FITC** – Fluoresceína isotiocianato

**GAG** – Glicosaminoglicano

**GAP** – Proteína ativadora de GTPase

**GAPDH** – Gliceraldeído-3-fosfato

**GDP** – Guanosina difosfato

**GEF** – Fator de troca do nucleotídeo guanina

**GPCR** – Receptor acoplado à proteína G

**GSK-3 $\beta$**  – Quinase de síntese de glicogênio 3 beta

**GTP** – Trifosfato de guanosina

**HA** – Ácido hialurônico

**hCG** – Gonadotrofina coriônica humana

**HLA** – Antígeno leucocitário humano

**IFN- $\gamma$**  – Interferon gama

**IL**- Interleucina

**KIR** – Receptor semelhante a imunoglobulina de células assassinas

**LDL** – Lipoproteína de baixa densidade

**LILRB1** – Receptor leucocitário tipo imunoglobulina 1

**LIMK** – Lim quinase

**LLC** – Carcinoma pulmonar de Lewis

**MEC** – Matriz extracelular

**MET** – Transição mesenquimal-epitelial

**MHC** – Complexo principal de histocompatibilidade

**MLC** – Cadeia leve da miosina II

**MMP** – Metaloproteinase de matriz

**mRNA** - Ácido ribonucléico tipo mensageiro

**MyD88** – Fator Fator mielóide de diferenciação 88

**MYPT1** – Fosfatase de miosina 1

**NK** – *Natural Killer*

**NKT** – *Natural killer T*

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**PAMP** – Padrões moleculares associados a patógenos

**PBS** – Tampão fosfato salina

**PCR** – Reação em cadeia de polimerase

**PDGF** – Fator de crescimento derivado de plaquetas

**PE** – Ficoeritrina

**PG** – Proteoglicano

**PRR** – Receptor de reconhecimento de padrão

**PSGL-1** – Glicoproteína ligante da P-selectina 1

**PTEN** – Fosfatase homóloga à tensina

**Rho** – Família de proteínas homólogas a Ras

**RNA** – Ácido ribonucleico

**ROCK** – Quinase espiralada associada a Rho

**RTK** – Receptor de tirosina quinase

**RT-PCR** – Reação em cadeia de polimerase com transcriptase reversa

**SA-PE** – Estreptavidina-ficoeritrina

**SBF** – Soro bovino fetal

**siCt** – Controle do silenciamento

**siRNA** – RNA pequeno de interferência (*small interfering RNA*)

**siVCAN** – silenciado para versicam

**TGF- $\beta$**  – Fator de crescimento transformador beta

**TIMP** – Inibidor tecidual de metaloproteinase

**TIR** – Receptor *toll*/interleucina 1

**TLR** – Receptor tipo *Toll-like*

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa

**TRAM** – Molécula adaptadora relacionada a TRIF

**TRIF** - Adaptador indutor de interferon contendo domínio TIR

**TRITC** - Isotiocianato de tetrametilrodamina

**VCAN** – Versicam

**VEGF** – Fator de crescimento do endotélio vascular

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	22
2.1 Matriz Extracelular .....	22
2.2 Proteoglicanos.....	22
2.3 Versicam .....	24
2.3.1 Estrutura Molecular.....	25
2.3.2 Funções.....	26
2.3.2.2 <i>Morte e Sobrevivência</i> .....	30
2.3.2.3 <i>Diferenciação</i> .....	31
2.3.2.4 <i>Migração</i> .....	32
2.3.2.5 <i>Inflamação</i> .....	34
2.3.3 Receptores e Vias de Sinalização.....	35
2.4. Placentação e Interação Materno-Fetal.....	38
2.4.1 Invasão Trofoblástica .....	41
3 OBJETIVOS.....	44
4 METODOLOGIA.....	45
4.1 Cultura de células.....	45
4.2 Silenciamento gênico para o versicam.....	45
4.3 Marcação para faloidina e imunofluorescência .....	46
4.4 Análise da expressão de versicam e via de sinalização Rho/ROCK por citometria de fluxo .....	47
4.5 Análise da morte celular por citometria de fluxo .....	48
4.6 Extração de RNA e RT-PCR semi-quantitativo .....	48
4.7 Detecção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA) e de citometria por <i>beads</i> .....	49
4.8 Ensaio de proliferação e ciclo celular por meio da análise de Ki-67.....	50
4.9 Ensaio de motilidade .....	51
4.9.1 Ensaio de ferida <i>in vitro</i> .....	51
4.9.2 Ensaio de videomicroscopia <i>Time-lapse</i> .....	51
4.9.3 Ensaio de invasão em fibronectina.....	52
4.10 Análises Estatísticas.....	52
5 RESULTADOS .....	53

5.1 Expressão de versicam e eficiência do silenciamento gênico para versicam em células HTR-8/SVneo .....	53
5.2 Efeitos do silenciamento gênico de versicam na viabilidade celular.....	55
5.3 Efeito do silenciamento gênico de versicam na proliferação e ciclo celular .....	56
5.4 Efeitos do silenciamento gênico de versicam sobre a produção de citocinas.....	59
5.5 Efeito do Silenciamento Gênico de Versicam na Expressão de pFAK .....	61
5.6 Efeito do silenciamento gênico de versicam na migração celular .....	63
5.7 Efeito do silenciamento gênico de versicam na invasão celular.....	67
5.8 Efeito do silenciamento gênico de versicam na sinalização RhoA/ROCK2 .....	67
6 DISCUSSÃO.....	69
7 CONCLUSÕES .....	77
REFERÊNCIAS .....	78

## 1 INTRODUÇÃO

O versicam é uma molécula membro da família dos proteoglicanos ligantes ao ácido hialurônico (MARGOLIS e MARGOLIS, 1994) e funcionalmente permite que a matriz extracelular (MEC) mantenha uma estrutura hidratada e organizada de modo a criar um agregado de moléculas mecanicamente ativas ao redor das células, as influenciando a mudar de forma, aderir, proliferar, migrar ou mesmo induzir remodelação da própria MEC (BINDER et al., 2016; SOTOODEHNEJADNEMATALAHI e BURKE, 2013). A expressão de versicam é muito importante durante o desenvolvimento embrionário de vários tecidos e órgãos, principalmente induzindo a migração de células embrionárias para a formação do coração em camundongos (HENDERSON e COPP, 1998; BURNS et al., 2014) e na migração de células da crista neural (PERISSINOTTO et al., 2000). No entanto, o versicam é pouco expresso em tecidos adultos sadios, os mais importantes sendo cérebro, pele, baço, adrenal, músculo liso, coração e endométrio (BODE-LESNIEWSKA et al., 1996; NASO et al., 1995; SOTOODEHNEJADNEMATALAHI e BURKE, 2013).

Além de suas propriedades estruturais na matriz extracelular, o versicam vem sendo descrito como uma importante molécula sinalizadora autocrinamente e paracrinamente, induzindo proliferação, migração, invasão e metástase de células neoplásicas (SAKKO et al., 2001; WIGHT et al., 2014). Este proteoglicano também é conhecido por possuir cinco variantes de *splicing*: V0, V1, V2, V3 (KEIRE et al., 2014) e V4 (KISCHEL et al., 2010). As isoformas V0 e V1 estão envolvidas no desenvolvimento embrionário, assim como com a indução de crescimento, invasão e metástase de células neoplásicas (DU et al., 2013; WIGHT et al., 2014). A isoforma V2 está envolvida com inibição de proliferação, diferenciação e migração de células do sistema nervoso central (LEE et al., 2015) e a isoforma V3 é conhecida por aumentar elastogênese e regular migração de células de músculo liso arterial (ASMCs) (MERRILEES et al., 2014). Já a isoforma V4 foi relatada por ser regulada positivamente em lesões de câncer de mama humano (KISCHEL et al., 2010), mas não existem mais relatos sobre sua localização e funções.

O versicam não atua somente como um componente estrutural na MEC, mas também influencia nas funções e comportamentos celulares por meio de interações mediadas pelo domínio G3 com o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF-R) (DOMENZAIN et al., 2003). Além disso, o versicam interage com receptores na superfície das células, como CD44, glicoproteína ligante de P-selectina-1 (PSGL-1), receptor similar ao *Toll 2* (TLR-2), P- ou L-selectinas e integrina  $\beta 1$  (HIROSE et al., 2001; KAWASHIMA et al., 2002;

KAWASHIMA et al., 2000; KIM et al., 2009; TAYLOR e GALLO, 2006; WANG et al., 2009; WU et al., 2005; ZHENG et al., 2004; GENBACEV et al., 2003, WU et al., 2003). Por meio da interação com esses receptores, fornece sinais intrínsecos que podem influenciar o sistema imunológico e causa um fenótipo celular inflamatório (WIGHT et al., 2014). Assim, em um contexto de progressão tumoral, o versicam é capaz de ativar diferentes tipos de células inflamatórias por intermédio do receptor *Toll-like 2* (TLR-2) e, em seguida, promover a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) e IL-6, promovendo fortemente a progressão do tumor (KIM et al., 2009). Além disso, células inflamatórias e neoplásicas aumentam a expressão de versicam, que por sua vez induz uma cascata de secreção de citocinas inflamatórias a gerar um microambiente inflamatório que propicia a progressão tumoral e metástases (GAO et al., 2012).

Além dos efeitos pró-inflamatórios, a interação de versicam com os receptores relatados pode gerar um aumento de fenótipo mesenquimal migratório (WU et al., 2002), podendo ocorrer a ativação da via de sinalização Rho-GTP/ROCK (Rho, família de proteínas homólogas a Ras; ROCK, proteína quinase associada a Rho), a qual é essencial em eventos celulares como proliferação, migração, fagocitose, polimerização de microtúbulos, adesão e organização de citoesqueleto, entre outros (HARTMAN et al., 2015). Interessantemente, essa via de sinalização também possui papel-chave durante a implantação embrionária e placentação, eventos dependentes da migração e invasão de células trofoblásticas (SHIOKAWA et al., 2002; ALARCON e MIRIKAWA, 2018).

A placenta é um órgão temporário, exclusivo da gestação e geneticamente misto. É uma estrutura altamente especializada e fundamental para uma correta evolução da gravidez, possuindo diversas funções miméticas às de outros órgãos. A placenta é composta por diferentes estruturas: o córion viloso (porção fetal) e a decídua basal (porção materna). As vilosidades coriônicas crescem do córion e se ramificam intensamente para fornecer uma grande área de contato entre as circulações fetal e materna. Na placenta madura, o sangue materno entra no espaço interviloso pelas artérias espiraladas uterinas e circula ao redor das vilosidades coriônicas, permitindo as trocas gasosas e de nutrientes (BENIRSCHKE et al., 2006). O córion viloso tem suas vilosidades revestidas por células trofoblásticas: sincitiotrofoblasto externamente e citotrofoblasto viloso internamente, o qual se localiza sobre o mesênquima embrionário rico em macrófagos (células de Hofbauer) e capilares fetais (BOYD e HAMILTON, 1970). Por sua vez, a decídua basal é composta por células e estruturas maternas, como glândulas endometriais, células decíduais, leucócitos e vasos sanguíneos (BENIRSCHKE et al., 2006), além de células trofoblásticas fetais. Em uma

primeira onda de invasão, o sinciciotrofoblasto invade a decídua basal, estabelecendo uma interface materno-fetal primordial (BOYD e HAMILTON, 1970). Em uma segunda onda de invasão, células do citotrofoblasto viloso transpassam os limites das vilosidades coriônicas, se diferenciando nas células do citotrofoblasto extraviloso (EVT) (RED-HORSE et al., 2004), que realizam uma invasão mais profunda dos tecidos maternos. Essas células possuem intensa capacidade de invasão durante o primeiro trimestre da gestação, invadindo a decídua basal e as artérias espiraladas uterinas, também as remodelando (PIJNENBORG et al., 2006).

O comportamento das células EVT é muito semelhante ao de células neoplásicas (CORVINUS et al., 2003), entretanto essa invasão é altamente controlada temporal e espacialmente (WALLACE et al., 2012). Esse controle na invasão, em gestações normais, é controlada por fatores derivados do trofoblasto, bem como das células maternas. De uma maneira geral, células trofoblásticas intersticiais são equipadas com diferentes sistemas de protease, permitindo a degradação de proteínas da MEC para promover a migração celular, enquanto a decídua expressa uma variedade de proteínas inibitórias, restringindo a invasividade. Células trofoblásticas migratórias expressam diferentes membros da família das metaloproteinases de matriz (MMPs), catepsinas e ativador de plasminogênio tipo uroquinase (BISCHOF et al., 2000; LALA e CHAKRABORTY, 2003; VARANOU et al., 2006). No entanto, as células deciduais produzem inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) e do inibidor do ativador do plasminogênio (LALA e GRAHAM, 1990; SCHATZ e LOCKWOOD, 1993).

No entanto, alterações nos processos de migração e invasão das células trofoblásticas são motivos de grande preocupação durante a gestação, por serem causa ou consequência de doenças graves que apresentam grande morbidade e mortalidade materna e fetal. Uma variedade de complicações pode resultar de uma disfunção da migração das células trofoblásticas, tais como a manifestação de hemorragias antes, durante ou após o parto, as quais representam 23,1% das mortes maternas na América Latina (SAY et al., 2014). Uma das principais causas é a placenta acreta ou placenta anormalmente invasiva (AIP), doença gestacional caracterizada pela reação decidual ausente ou defeituosa, mantendo o estroma endometrial como um tecido conjuntivo frouxo (Kraus, et al., 2004; Benirschke et al., 2006), fato que por muitos anos foi creditado ser a causa primária da invasão exacerbada das células EVT e consequentemente, da AIP (Irving e Hertig, 1937). Particularmente de alta severidade, a AIP não possui biomarcadores específicos, é diagnosticada apenas por técnicas de imagem com baixa sensibilidade e o tratamento padrão é a remoção total do útero por meio de histerectomia, representando um problema ainda maior em regiões mais carentes, onde faltam

os equipamentos de imagem apropriados e possuem altos índices de subdiagnóstico e subnotificação (MORSE et al., 2011).

Outrossim, mesmo sendo importante durante o desenvolvimento embrionário, o versicam foi pouco estudado durante a implantação embrionária e placentação, sendo conhecido que em camundongos, o versicam é regulado positivamente em células decíduais após a implantação embrionária (SAN MARTIN et al., 2003). Devido à carência de estudos relacionando a expressão de versicam na placentação saudável e em doenças invasivas, nosso grupo vem trabalhando para determinar a localização e funções fisiológicas do versicam durante a gestação, assim como suas funções em diversas doenças gestacionais (SANTOS e GONÇALVES *et al.* Submetido; PIRES e GONÇALVES et al., 2018). No estudo de Santos e Gonçalves e colaboradores (submetido), um aumento da expressão gênica e proteica de versicam em células EVT presentes em placentas de primeiro trimestre e na AIP, revela uma possível ligação com o aumento da atividade invasiva do EVT em ambas situações, recentemente correlacionadas por apresentarem as mesmas características invasivas e de marcadores de transição epitélio-mesenquimal (DaSILVA-ARNOLD et al., 2018).

Por conseguinte, visto que o versicam parece ser importante para a invasão das células trofoblásticas no primeiro trimestre e na AIP, assim como a carência de modelos para se estudar o comportamento da célula EVT na AIP, neste trabalho objetivamos mostrar as funções que o versicam desempenha naturalmente em células da linhagem HTR-8SV/neo, advindas de células trofoblásticas de primeiro trimestre de gestação e como podemos afetar essas funções por intermédio do silenciamento gênico do versicam, realizando um mapeamento funcional de sua ação para eventuais terapias futuras.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Matriz Extracelular

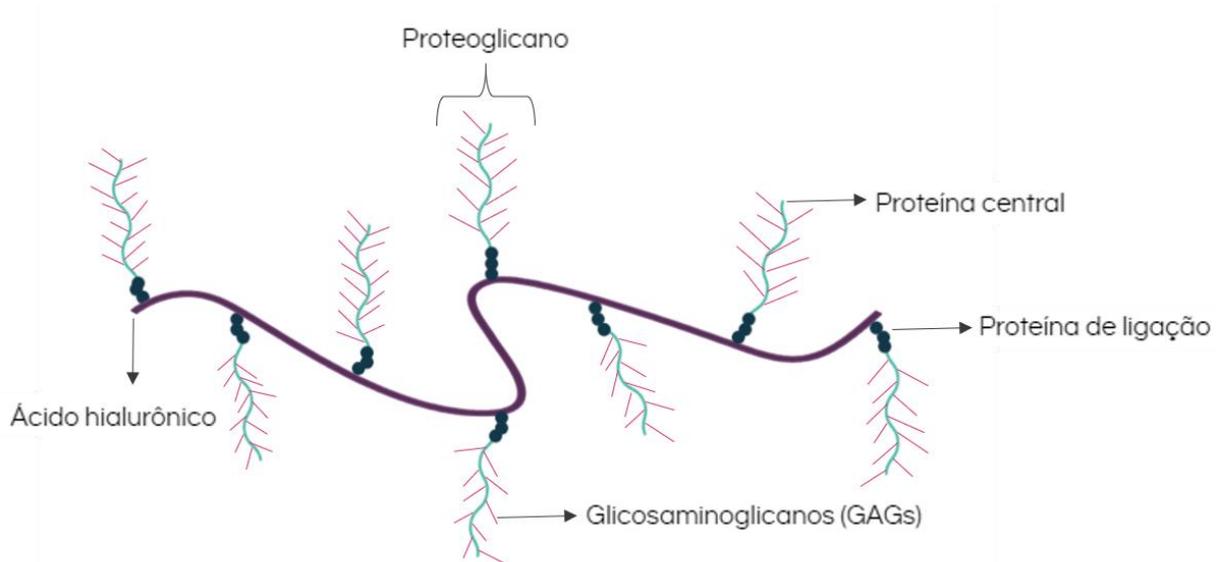
A matriz extracelular (MEC) é uma estrutura tridimensional não celular composta por diferentes combinações de proteínas, fibras colágenas e elásticas, glicoproteínas, glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos (PGs). Os componentes da MEC ligam-se uns aos outros, assim como aos receptores de adesão celular, formando uma rede complexa na qual as células residem (THEOCHARIS et al., 2016). Essa rede macromolecular regula e provê às células mecanismos essenciais para a migração, diferenciação, sobrevivência e proliferação (RICCIARDELLI e RODGERS; 2006). A MEC possui características funcionais variáveis, como proporcionar suporte estrutural e desempenhar um importante papel biológico nos eventos celulares e, em alguns tecidos, sendo meio de troca de nutrientes e catabólitos entre células e seu suprimento sanguíneo para as células que compõe os tecidos (CARVALHO e RECCO-PIMENTEL, 2001). Além disso, as células presentes na MEC interagem com a mesma através de seus receptores de superfície, como integrinas, PGs de superfície celular e o CD44, receptor de ácido hialurônico (HA), por exemplo (FERRARI et al., 2016). Variações na composição e estrutura dos componentes da MEC afetam tanto a estrutura geral quanto as propriedades biomecânicas da rede formada (KIRKPATRICK e SELLECK, 2007; ROZARIO e DeSIMONE, 2010).

### 2.2 Proteoglicanos

Os proteoglicanos (PGs) são componentes estruturais abundantes da MEC e estão entre as biomacromoléculas estruturais e funcionais mais importantes nos tecidos com um importante papel estrutural assim como as fibras colágenas (DONG HUN LEE et al, 2016). Essas moléculas estão envolvidas em variadas funções celulares tais como adesão celular, interações com fatores de crescimento e remodelação da MEC (Ruoslahti e Yamaguchi, 1991; Wight, 1989). Os PGs dispõem de um eixo protéico que interage de maneira covalente com cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs) (Fig. 1) (HASCALL e KIMURA, 1982; IOZZO e MURDOCH 1996).

Essas moléculas podem ser classificadas em quatro grupos principais de acordo com sua localização, que são os associados à superfície celular, extracelular, pericelular e intracelular. Cada grupo principal é classificado em famílias de acordo com sua homologia de genes, propriedades do cerne proteico, tamanho e composição (THEOCHARIS et al., 2010). Dentro do grupo dos PGs extracelulares, se encontra a família dos grandes proteoglicanos de ligação

ao ácido hialurônico e lectina denominados hialectanos, que tem sido muito estudada por estarem envolvidos em diversas funções regulatórias de fenômenos celulares (IOZZO e SCHAEFER, 2015).



**Figura 1. Estrutura geral de proteoglicanos da família dos lecticanos e sua ligação com o ácido hialurônico.** Fonte: adaptado de King, M. W. (2017), disponível em <<https://themedicalbiochemistrypage.org>>

Os proteoglicanos se ligam a diversos fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, receptores de superfície celular e moléculas de MEC por meio de suas proteínas centrais ou de suas cadeias laterais de GAGs, participando de diversos fenômenos funcionais celulares na regulação de proliferação, adesão, migração, diferenciação e apoptose (THEOCHARIS et al, 2010; AFRATIS et al., 2012; IOZZO, e SANDERSON, 2011; IOZZO, e SCHAEFER, 2015; THEOCHARIS et al, 2014; THEOCHARIS et al., 2015). Devido à sua capacidade de interagir com outras moléculas e células da MEC circunvizinha, os PGs também são moléculas importantes para a organização da estrutura da MEC, contribuindo assim para a formação de um arcabouço onde se incorporam as moléculas de MEC. A MEC e, consequentemente, os PGs e GAGs presentes na mesma, desempenham papéis importantes na fisiologia normal e na manutenção da homeostase normal do tecido e no desenvolvimento de várias doenças, uma vez que sua biossíntese é marcadamente modificada durante a remodelação da MEC em todas as doenças, sendo possível o uso de determinadas moléculas de MEC como potenciais alvos terapêuticos (JARVELAINEN et al., 2009; THEOCHARIS et

al., 2010; AFRATIS et al., 2012; IOZZO, e SANDERSON, 2011; IOZZO, e SCHAEFER, 2015; THEOCHARIS et al, 2014; THEOCHARIS et al, 2015).

Dentre as várias famílias de proteoglicanos existentes, a família dos grandes proteoglicanos portadores de sulfato de condroitina, denominados lecticanos ou ligantes ao ácido hialurônico, tem sido muito estudada por suas diferentes funções. Esta família é representada pelos proteoglicanos brevicam, agrecam, versicam e neurocam (HOWELL et al., 2012; DYCK e KARIMI-ABDOLREZAEI, 2015) e é conhecida por estar envolvida em processos celulares importantes como adesão celular e crescimento, migração e invasão celular. Também é reconhecido que a presença desses proteoglicanos é crítica em mecanismos de crescimento e reparação neuronal, incluindo a orientação de axônios após lesões em componentes do sistema nervoso, tais como medula espinal e cérebro (AVRAM et al., 2014).

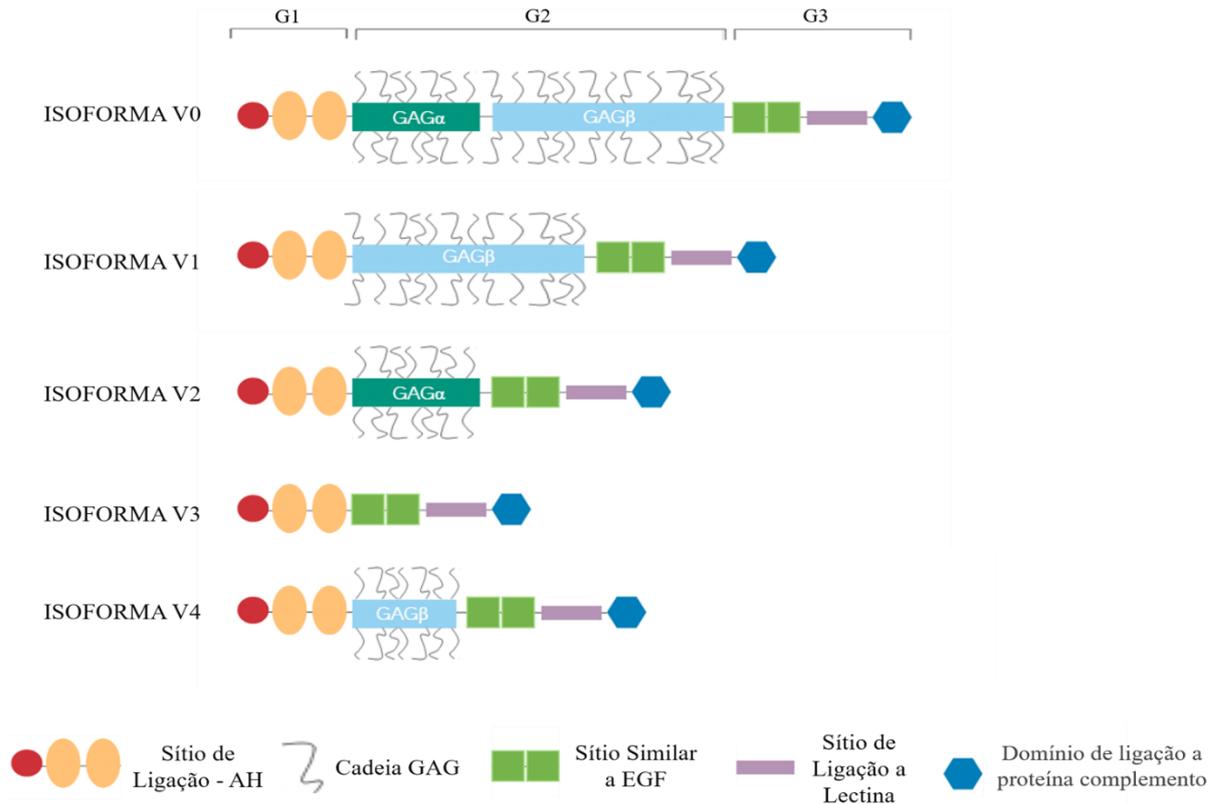
### 2.3 Versicam

O versicam (VCAN), também conhecido como PG-M ou CSPG2 (Proteoglicano de sulfato de condroitina 2) (NANDADASA et al., 2014), é um proteoglicano de MEC considerado o maior membro pertencente à família dos proteoglicanos de sulfato de condroitina, também denominada família dos lecticanos ou hialectanos (IOZZO e SCHAEFER, 2015). Esse PG é encontrado na matriz extracelular de uma variedade de tecidos e possui um cerne protéico contendo diversos domínios globulares. Um destes domínios reconhece e se liga ao ácido hialurônico, enquanto também apresenta domínios de ligação para vários outros componentes da matriz extracelular. Esse proteoglicano possui carga negativa devido às suas cadeias de GAGs e por isso possui uma característica hidrofílica, contribuindo para a viscoelasticidade do microambiente pericelular (EVANKO et al., 2007). É ainda importante ressaltar que em tecidos normais os níveis de versicam são baixos, mas em algumas doenças os níveis desse proteoglicano aumentam substancialmente, tais como arteriosclerose (WIGHT et al., 2014), e câncer de mama, próstata (DU et al., 2013), e leiomioma (KEIRE et al., 2014).

O versicam interage com diversos componentes de MEC, tais como o ácido hialurônico, fibronectina e fibrilina (EVANKO et al., 2007) para criar um agregado de moléculas mecanicamente ativas em torno das células, as influenciando a mudar de forma, aderir, proliferar, migrar e remodelar a MEC. O versicam e as moléculas de MEC que se ligam a esse proteoglicano podem modificar a rigidez mecânica em torno de células contribuindo para alterações que influenciam o comportamento e o fenótipo celular (DISCHER et al., 2009; WERFEL et al., 2013).

### 2.3.1 Estrutura Molecular

O versicam é composto por três domínios principais com funções distintas: um domínio globular G1 ou região N-terminal, que medeia a ligação ao ácido hialurônico; na região central da proteína estão os domínios de *splicing* alternativo  $\alpha$ - e  $\beta$ -glicosaminoglicanos (GAG- $\alpha$  e GAG- $\beta$ ) e um domínio G3 ou região C-terminal, que contém um domínio de ligação à lectina do tipo C, duas repetições do fator de crescimento epidérmico (EGF) e uma região de ligação a proteína do complemento (Fig. 2) (ZIMMERMANN e RUOSLAHTI, 1989; WIGHT, 2002; DOMENZAIN et al., 2003; SOTOODEHNEJADNEMATALAHI e BURKE, 2013). Essa molécula também é conhecida por ocorrer em pelo menos cinco variantes de *splicing*: as isoformas V0, V1, V2, V3 (KEIRE *et. al.*, 2014) e V4 (KISCHEL et al., 2010) (Fig. 2). As isoformas de versicam resultam do *splicing* alternativo dos éxons 7 e 8, os quais codificam os domínios GAG- $\alpha$  e GAG- $\beta$ , respectivamente. A isoforma V0 contém ambos os éxons que codificam os domínios GAG e é a maior isoforma, contendo até 23 cadeias de glicosaminoglicanos. A isoforma V1 contém apenas o éxon 8 e tem até 15 cadeias GAG; a isoforma V2 contém apenas o éxon 7 e tem até 8 locais de conexão GAG, enquanto V3 não contém nenhum éxon grande e, portanto, não possui cadeias GAG (ZIMMERMANN *et al.*, 1994; ZAKO et al., 1995). A isoforma V4 de versicam apresenta o domínio G1, os primeiros 398 aminoácidos da região GAG- $\beta$  e o domínio G3, possuindo 5 cadeias GAG (KISCHEL et al., 2010).



**Figura 2. Isoformas de versicam.** GAG – glicosaminoglicanos; EGF – fator de crescimento epidérmico. Fonte: adaptado de Nandadasa et al., 2014.

O versicam participa de várias interações intermoleculares com a MEC por meio do seu domínio G3, especialmente com fibrilinas, fibulinas, tenascina-R, fibronectina e integrina  $\beta 1$ , assim como com citocinas, selectinas, e CD44, por intermédio das cadeias GAG (WU et al., 2005). As isoformas V0 e V1 de versicam são expressas no coração e membros em desenvolvimento, fibroblastos e tecidos cartilagosos, enquanto V2 e V3 são as isoformas predominantes no sistema nervoso central e células vasculares do músculo liso, respectivamente (SCHMALFELDT et al., 2000; EVANKO et al., 1999; LEMIRE et al., 1999; ZIMMERMANN e DOURS-ZIMMERMANN, 2008).

### 2.3.2 Funções

Os papéis funcionais do versicam são múltiplos e complexos (tabela 1). Sua expressão encontra-se aumentada durante a embriogênese, em locais de lesão tecidual (LANDOLT et al., 1995) e em neoplasias de mama (KISCHEL et al., 2010), do trato gastrointestinal (THEOCHARIS, 2002), de próstata (SAKKO et al., 2003), de cérebro (SCHWARTZ e DOMOWICZ, 2004), colo uterino (KODAMA et al., 2007), pele (DOMENZAIN et al., 2003) e de músculo liso (KEIRE et al., 2014). Muitos trabalhos também destacaram o papel do

versicam na cicatrização de feridas (CATTARUZZA et al., 2002), na angiogênese, no crescimento tumoral (ZHENG et al., 2004) e nas doenças vasculares, especialmente na aterosclerose (TALUSAN et al., 2005; KENAGY et al., 2006). Já foi demonstrado que o versicam pode se ligar a partículas de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e acredita-se que o acúmulo de versicam nos vasos sanguíneos promove a retenção de lipoproteínas extracelulares, sugerindo funções relacionadas ao acúmulo de lipídios, inflamação e trombose (WIGHT e MERRILEES, 2004; OLIN et al., 1999). O domínio G1, que contém uma região de ligação ao ácido hialurônico, desempenha um papel na mediação da proliferação celular, adesão e migração, ao passo que o domínio G3 está envolvido no controle do fenótipo das células e sinalização celular por meio de sua associação com as integrinas e EGF-R (DOMENZAIN et al., 2003; WU et al., 2002). Entre os domínios terminais G1 e G3 do versicam, estão os domínios de *splicing* alternativo  $\alpha$ - e  $\beta$ -glicosaminoglicanos (GAG) importantes para a biologia do versicam.

Especificamente sobre as isoformas do versicam, V0 e V1 são as predominantemente produzidas durante a embriogênese e a expressão aumentada destas isoformas está associada ao crescimento tumoral, aumento de invasividade e metástase (DU et al., 2013). A isoforma V0 é, sobretudo, prevalente durante o desenvolvimento embrionário inicial (PERISSINOTTO et al., 2000), mas menos presente nos tecidos adultos saudáveis (CATTARUZZA et al., 2002). A isoforma V1 de versicam também é relatada como sendo capaz de aumentar a proliferação celular e proteger os fibroblastos da linhagem NIH-3T3 da morte por apoptose (SHENG et al., 2005).

A isoforma V2 de versicam é expressa principalmente no sistema nervoso central adulto, sendo pouco expressa em outros locais (SCHMALFEDT et al., 2000) e pode exibir atividades biológicas opostas à ação da isoforma V1, inibindo a proliferação celular e sem qualquer associação com a resistência à apoptose (SHENG et al., 2005). Além disso, essa isoforma de versicam também já foi descrita como um importante inibidor do crescimento axonal de neurônios do sistema nervoso central maduro (SCHMALFEDT et al., 2000).

A isoforma V3 de versicam é expressa principalmente em ASMCs e pouco expressa em outros tecidos (KEIRE et al., 2014). Estudos *in vitro* demonstraram que essa isoforma de versicam pode ser expressa em células endoteliais após ativação por TNF- $\alpha$  e VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) (CATTARUZZA et al., 2002). A superexpressão de V3 em ASMCs arteriais resultou no aumento da adesão às garrafas de cultura (fenômeno observado por meio da demonstração de resistência dessas células à tripsinização) mas reduziu a proliferação celular e a migração dessas células em ensaios de ferida *in vitro*

(LEMIRE et al., 2002). Além disso, em células de melanoma a isoforma V3 reduziu intensamente o crescimento celular *in vitro* e *in vivo* (SERRA et al., 2005), mas também foi capaz de promover metástase para o pulmão *in vivo* (MIQUEL-SERRA et al., 2006), sugerindo que a isoforma V3 de versicam pode exercer uma função dupla, sendo um inibidor do crescimento do tumor primário, porém, estimulando o processo metastático (RICCIARDELLI et al., 2009). Além das quatro isoformas mais conhecidas, pouco se conhece ainda a respeito da isoforma V4 de VCAN, a qual foi relatada como a mais recente isoforma deste PG, sendo regulada positivamente em lesões de câncer de mama humano (KISCHEL et al., 2010).

Em resumo, ainda são escassos estudos que atribuam funções distintas às isoformas de versicam individualmente, visto que existe uma escassez de anticorpos específicos, *kits* de silenciamento e proteínas recombinantes das isoformas. Sendo assim, a maioria dos trabalhos ainda utilizam com o versicam total e não das isoformas.

Isoforma	Local de expressão	Função
V0	Tecidos embrionários (crista neural), e neoplasias, placenta, pulmão (PERISSINOTTO et al., 2000; DU et al., 2013; WIGHT et al., 2014; CATTARUZZA et al. 2002).	Crescimento tumoral, aumento de invasividade e metástase (DU et al., 2013).
V1	Tecidos embrionários (crista neural), placenta, pulmão, células de músculo esquelético (PERISSINOTTO et al., 2000; CATTARUZZA et al. 2002).	Crescimento tumoral, aumento de invasividade e metástase (DU et al., 2013), proliferação celular (SHENG et al., 2005).
V2	Sistema nervoso central adulto (SCHMALFEDT et al., 2000).	Inibição de proliferação, diferenciação e migração de células do sistema nervoso central (LEE et al., 2015).

V3	ASMCs (KEIRE et al., 2014).	Redução da proliferação celular e a migração de ASMCs <i>in vitro</i> (LEMIRE et al., 2002; CATTARUZZA et al. 2002).
V4	Lesões de câncer de mama humano (KISCHEL et al., 2010).	O papel específico de V4 durante a progressão do câncer de mama ainda necessita de mais investigações (KISCHEL et al., 2010).

**Tabela 1. Localização e principais funções das isoformas de versicam.**

#### 2.3.2.1 Proliferação

Em tecidos submetidos à proliferação celular, ocorre um acúmulo de versicam na MEC. Em resposta à fatores de crescimento, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e ao fator de transformação de crescimento beta 1 (TGF- $\beta$ 1), ocorre o aumento do versicam e de proteínas associadas, como o ácido hialurônico e seu receptor CD44, permitindo maior interação entre eles (LEE et al., 1993; WIGHT, 2002). Esses complexos formados ampliam a MEC e aumentam a natureza viscoelástica da matriz pericelular, criando um ambiente altamente maleável e flexível que suporta as mudanças necessárias para que ocorra a proliferação e migração celular (EVANKO et al., 2007; WIGHT et al., 2014).

Além desses efeitos, o versicam, por si mesmo, pode influenciar a proliferação, atuando como um mitógeno. Isso acontece pela ligação do VCAN ao EGF-R por intermédio de sequências do EGF (fator de crescimento epidérmico) no domínio G3 da molécula (WU et al., 2005; WIGHT et al., 2014). Desse modo, a expressão de versicam está associada a um fenótipo celular proliferativo e vem sendo encontrada em tecidos que exibem proliferação elevada, como no desenvolvimento embrionário e em uma variedade de neoplasias (DU et al., 2013). No câncer de próstata, os níveis de versicam no estroma se correlacionam positivamente com a progressão do câncer e estudos de cultura celular sugerem que os níveis elevados desse proteoglicano resultam de produção de sinais em células neoplásicas que, por meio de um mecanismo parácrino envolvendo TGF- $\beta$ 1, induzem células-tronco hospedeiras a aumentar a síntese de versicam (RICCIARDELLI et al., 1997; WIGHT, 2002). No câncer de

mama, verificou-se uma correlação positiva semelhante entre versicam peritumoral em pacientes acometidos e sobrevida livre de recaída, isto é, níveis baixos para o versicam indicam uma maior sobrevivência, com menor chance de retorno da doença (RICCIARDELLI et al., 2002).

Além disso, foi demonstrado que o versicam purificado e adicionado ao meio de cultura em uma linhagem celular de melanoma induziu a proliferação dessas células (TOUAB et al., 2002) e experimentos de silenciamento gênico com RNA pequeno de interferência (do inglês “*small interfering RNA*”, siRNA) de versicam levaram à mesma conclusão em ASMC (HUANG et al., 2006; HERNÁNDEZ et al., 2011). Por meio de numerosos mecanismos, a expressão de versicam está associada a uma alta taxa de proliferação e sua intrínseca relação com características do crescimento tumoral maligno indicam que sua expressão provavelmente está envolvida com a tumorigênese (DU et al., 2013).

#### 2.3.2.2 Morte e Sobrevivência

Em condições normais, pontos de controle potentes induzem senescência ou apoptose para restringir a expansão de células que foram submetidas a ativação de oncogenes e subsequentes aumentos de proliferação (EVAN e VOUSDEN, 2001). Para que um clone neoplásico sobreviva, precisam ocorrer modificações genéticas ou epigenéticas na sua maquinaria de sinalização apoptótica (IGNEY e KRAMMER, 2002).

Além dos efeitos sobre a capacidade proliferativa, estudos demonstram que o versicam aumenta a sobrevivência celular e a resistência apoptótica (LAPIERRE et al., 2007). A expressão dos domínios G1 e G3 do versicam protege as células da apoptose induzida por ligação a receptores de morte ou drogas citotóxicas (CATTARUZZA et al., 2004). Além disso, células transfectadas com a isoforma V1 exibem maior sobrevida em condições sem soro e contêm níveis diminuídos de moléculas pró-apoptóticas (SHENG et al., 2005). Nosso grupo também demonstrou a influência do versicam na regulação desses processos, visto que o silenciamento gênico das isoformas V0 e V1 de VCAN em células trofoblásticas da linhagem BeWo, aumentou sua morte celular (PIRES et al., 2018).

Ademais, estudos mostram que pode haver pressão seletiva para a perda de moléculas como *Fas* (receptor de sinal de apoptose), uma vez que um clone em desenvolvimento encontra caminhos de supressão de tumores projetados para evitar sua expansão e que assim como ocorre no desenvolvimento neoplásico, a expressão aumentada do versicam resulta em sensibilidade reduzida aos caminhos pró-apoptóticos, caracterizando assim esse proteoglicano

como grande influenciador na sobrevivência celular e regulação da apoptose (LAPIERRE et al., 2007; DU et al., 2013).

### 2.3.2.3 Diferenciação

Na MEC cerebral, o versicam é um dos principais proteoglicanos envolvidos no controle da diferenciação e desenvolvimento neuronal (WU et al., 2004). Níveis elevados de versicam sintetizados por células-tronco embrionárias (ESCs) nos microambientes do corpo embrionário desempenham um papel fundamental na diferenciação de ESCs (SHUKLA et al., 2010; DU et al., 2013). O versicam também se mostrou capaz de facilitar a condrogênese e a morfogênese articular em camundongos (CHOOCHEEP et al., 2010). Em recente trabalho do nosso grupo, corroboramos a literatura, mostrando que as isoformas V0 e V1 estão envolvidas também na diferenciação de células do citotrofoblasto em sinciotrofoblasto *in vitro* (PIRES e GONÇALVES et al., 2018).

Além disso, o ácido hialurônico e o versicam são criticamente importantes na regulação dos processos de transição epitélio-mesenquimal (EMT) em diversos tecidos (CAMENISCH et al., 2000; ERDELYI et al., 2005; TOOLE et al., 2005; KERN et al., 2006; SHUKLA et al., 2010). A EMT é um mecanismo fisiológico que está presente durante o desenvolvimento embrionário e que se caracteriza pela mudança de fenótipo de células epiteliais para um fenótipo mesenquimatoso; também é encontrada em várias situações patológicas, como fibrose intersticial renal, adesão endometrial e no câncer (THIERY et al., 2009; SIPOS e GALAMB, 2012; DaSILVA-ARNOLD et al., 2018). O processo envolve mudanças na morfologia, aumento da invasividade e resistência à apoptose. Sendo assim, a ocorrência da EMT no epitélio de um órgão pode ser um dos passos iniciais no caminho da tumorigênese e recentemente tem sido muito associada à progressão do câncer e processo metastático (DAVE et al., 2012). A EMT também é conhecida por participar do estabelecimento de metástases à distância, permitindo que células cancerosas recuperem propriedades epiteliais e se integrem em órgãos distantes (YANG e WEINBERG, 2008).

Além de ser conhecido como regulador da transição epitélio-mesenquimal, o versicam também tem sido associado ao mecanismo reverso, à transição mesenquimal-epitelial (MET). Particularmente, a isoforma V1 é capaz de promover uma alteração na expressão de N-caderina (glicoproteína expressa em células mesenquimais) para a E-caderina (predominante em células epiteliais) em um estudo com fibroblastos (SHENG et al., 2006). Desse modo, o versicam se configura como molécula potencialmente importante nos processos de EMT e MET, implicados tanto na iniciação como na progressão da malignidade do câncer (Du et al., 2013).

Durante o desenvolvimento embrionário inicial da placenta, o EVT perde seu fenótipo epitelial organizado e transita para um fenótipo mesenquimal migratório e invasivo, permitindo a migração e a infiltração na decídua e vasos maternos (VICÓVAC e APLIN, 1996). Os mecanismos celulares que controlam a EMT em células trofoblásticas são pouco conhecidos, no entanto, sabe-se que o EGF atua como um indutor das vias de sinalização de EMT através de seus efeitos regulatórios sobre fatores de transcrição e seus genes alvo (NORMANNO et al., 2006; DAVIES et al., 2016); a expressão do fator de transcrição ZEB2 também é considerada essencial durante a diferenciação de células trofoblásticas, promovendo alterações consistentes com uma transição epitelial-mesenquimal associada a um aumento da invasividade desse tipo celular (DaSILVA-ARNOLD et al., 2018).

#### 2.3.2.4 Migração

Gerar um microambiente propício à migração, invasão e metástase é um dos principais efeitos do versicam (MITSUI et al., 2017). Esse proteoglicano é capaz de reduzir a adesão e promover a migração e a invasão de células neoplásicas (SAKKO et al., 2003; GHOSH et al., 2010; KUSUMOTO et al., 2010). Consequentemente, a indução da expressão estromal de versicam está correlacionada com maior grau de tumor e invasividade em neoplasias, além de estar associada à progressão tumoral (MUKARATIRWA et al., 2004; LABROPOULOU et al., 2006; DU et al., 2013).

Adicionalmente, o papel anti-adesivo de versicam foi mostrado em células de melanoma (TOUAB et al., 2002), células de carcinoma de próstata (SAKKO et al., 2003), células de astrocitoma (ANG et al., 1999) e em diversos outros tipos de células tumorais (KODAMA et al., 2007a, b; KOYAMA et al., 2007; RICCIARDELLI et al., 2007). Esse efeito inibitório sobre a adesão celular pode ser principalmente devido à presença das cadeias GAG que podem criar uma matriz extracelular mais hidratada, menos adequada para adesão. A expressão do domínio G1 do versicam pode aumentar a migração celular e reduzir a adesão em diferentes tipos de células, enquanto o domínio G3 é conhecido por induzir a adesão celular, através da via mediada por EGF e integrina  $\beta 1$  (WU et al., 2002; HERNÁNDEZ et al., 2010). Entretanto, em estudos com câncer de mama humano, o domínio G3 influenciou o aumento da invasão tumoral local e sistêmica das células (YEE et al., 2007).

Predominantes em neoplasias, as isoformas V0 e V1 também são descritas como reguladoras do processo de migração celular (ARSLAN et al., 2007; RICCIARDELLI et al., 2009). A expressão dessas isoformas é aumentada no melanoma maligno (TOUAB et al., 2002), assim como no glioma maligno (ONKEN et al., 2014), o que contribui para o aumento

da taxa de proliferação e migração, além de diminuir a adesão das células tumorais. Essas células neoplásicas recrutam componentes do estroma para remodelar seu ambiente pericelular e promover sua motilidade, e o versicam tem a capacidade de aumentar o comportamento agressivo das células neoplásicas via interação com a MEC (DU et al., 2013). Juntamente com ácido hialurônico e CD44, o VCAN pode formar um complexo macromolecular na MEC, que modula a ligação das células ao substrato e é um fator chave na motilidade celular, e que pode contribuir para o processo metastático no câncer (RICCIARDELLI et al., 2006; WEEN et al., 2011). Desse modo, essas isoformas são conhecidas pela relação com um fenótipo maligno do tumor e pior prognóstico da doença (HERNÁNDEZ et al., 2011; ARSLAN et al., 2007; MITSUI et al., 2017).

Além da sua importante função reguladora na migração de células cancerígenas, o versicam também age na migração de células embrionárias no desenvolvimento do coração (HENDERSON e COPP, 1998), pode influenciar a capacidade migratória dos linfócitos T *naive*, diminuindo a ligação dessas células a uma matriz de ácido hialurônico, e por consequência, impedido sua migração (EVANKO et al., 2012) e guia a migração das células da crista neural (PERISSINOTTO et al., 2000). Sendo assim, diversos estudos funcionais fornecem evidências que apoiam o papel proposto de versicam como uma molécula proliferativa, anti-adesiva e pró-migratória, que está envolvida na mobilidade celular do câncer e sua progressão (RICCIARDELLI et al., 2006).

Em contrapartida, no sistema nervoso central, a isoforma V2 inibe o crescimento axonal e a migração. Esta inibição pode ser reduzida com a remoção das cadeias de sulfato de condroitina da molécula, indicando que vários domínios de versicam estão envolvidos no controle da regeneração de axônios (ZIMMERMANN e DOURS-ZIMMERMANN, 2008; WIGHT et al., 2014). A expressão da isoforma V3 do versicam diminui a proliferação e aumenta a adesão em células tumorais de melanoma, invertendo o fenótipo promovido pelas isoformas V0 e V1. Já a isoforma V3 interfere com a via CD44-EGFR / ErbB2 na regulação da proliferação e migração celular (SERRA et al., 2005; HERNÁNDEZ et al., 2011b).

A migração de leucócitos, dos vasos para o tecido lesado, é necessária para as respostas inflamatórias como parte da resposta imune inata. Após o extravasamento para o compartimento subendotelial, os leucócitos encontram a MEC, que funciona como um suporte para os leucócitos, influenciando sua adesão, migração, ativação e retenção (GILL et al., 2010; PARISH, 2006; SOROKIN, 2010; VADAY et al., 2001; VADAY e LIDER, 2000). O versicam interage com receptores presentes na superfície de células do sistema imunológico, tais como CD44, PSGL-1, receptor similar ao *Toll 2* (TLR2) e P- ou L-

selectinas (HIROSE et al., 2001; KAWASHIMA et al., 2002; KAWASHIMA et al., 2000; KIM et al., 2009; TAYLOR e GALLO, 2006; WANG et al., 2009; WU et al., 2005; ZHENG et al., 2004) e beneficia o fenótipo celular inflamatório. O Versican também interage com vários outros componentes da MEC que são importantes na inflamação, como o ácido hialurônico, fibronectina e tenascina-R e -C (DAY e DE LA MOTTE, 2005; HASCALL et al., 2004; LeBARON et al., 1992; LUNDELL et al., 2004). Tais interações também pode influenciar a formação de estruturas, na MEC, em resposta a citocinas inflamatórias, promovendo a adesão de leucócitos (LAUER et al., 2008; SELBI et al., 2006a; SELBI et al., 2004; SELBI et al., 2006b).

#### 2.3.2.5 *Inflamação*

A inflamação é um mecanismo essencial por meio do qual o sistema imune inato inicia uma resposta protetora à invasão de patógenos e lesões nos tecidos, podendo ou não evoluir para inclusão do sistema imune adaptativo (FULLERTON e GILROY, 2016). O grupo de sensores moleculares da imunidade inata é denominado de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e sua ativação envolve vários co-receptores e promove sinalização intracelular em cascatas inflamatórias (LIU e CAO, 2016). Desse grupo, podemos destacar os TLRs, os quais reconhecem duas classes de moléculas específicas: os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), provenientes de microorganismos como bactérias, fungos, protozoários e vírus; e os padrões moleculares associados ao perigo ou dano (DAMPs), que são liberados de tecido danificado, também conhecidos como alarminas, no fenômeno que se baseia em moléculas endógenas secretadas/liberadas durante dano tecidual por agente não-infeccioso para gerarem uma resposta imunológica (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002; MOGENSEN, 2009).

Alguns componentes da MEC também são capazes de atuar como DAMPs, incluindo o versican, que ao ser identificado pelos TLRs, inicia cascatas de sinalização envolvendo moléculas adaptadoras, como o fator mielóide de diferenciação 88 (MyD88), o adaptador indutor de interferon contendo domínio TIR (TRIF), e a molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM), o que culmina na ativação e translocação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) para o núcleo, com produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (TAKEUCHI e AKIRA, 2010; FREVERT et al., 2017). Apresentando forte atividade pró-inflamatória (WIGHT, 2002), o versican se liga ao receptor do tipo Toll 2 (TLR-2) e induz a produção do fatores pró-inflamatórios, criando um ambiente favorável para o crescimento tumoral (KIM et al., 2009). Além disso, versican é capaz de aumentar o recrutamento de leucócitos e o

intravasamento e extravasamento de células tumorais através do aumento da permeabilidade vascular local e estimula a liberação inflamatória de citocinas por células imunológicas (WIGHT et al., 2014). O versicam pode ainda atuar como um vínculo que liga a inflamação à progressão tumoral, bem como desempenhar um papel central na geração de um microambiente tumoral inflamatório (WIGHT et al., 2014). Estudos anteriores silenciaram gênica e o versicam em linhagem celular de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) e como resultado, reduz o acúmulo de citocinas inflamatórias associadas ao tumor causadas pela endostatina no tecido tumoral, tais como fator estimulador de colônias (CSF), TNF- $\alpha$ , IL-6, VEGF e IL-10, em camundongos inoculados com essa linhagem celular (WANG et al., 2015). Outro estudo que também realizou o silenciamento gênica e do versicam em células LLC resultou na redução da multiplicidade do tumor e na redução das metástases nas glândulas do pulmão, fígado e supra-renais quando as células tumorais foram implantadas subcutaneamente em camundongos (KIM et al., 2009).

Além do versicam intacto, a sua degradação proteolítica resulta na geração de fragmentos que também são DAMPs e são importantes na progressão do câncer, como a versicina, que é conhecida por ser pró-apoptótica (MCCULLOCH et al., 2009) e imunorregulatória (HOPE et al., 2016). Assim, o versicam íntegro ou fragmentado pode ser um iniciador na amplificação da resposta inflamatória em muitas doenças (ZHANG et al., 2012). Diante disso, a importância do versicam na inflamação reside na sua versatilidade e habilidade para se ligar a uma grande variedade de receptores e outros componentes inflamatórios para regular sua disponibilidade e atividade (WIGHT et al., 2014).

### 2.3.3 Receptores e Vias de Sinalização

O versicam interage com receptores na superfície das células, como CD44, glicoproteína ligante de P-selectina-1 (PSGL-1), *Toll-like receptor 2* (TLR2), P- ou L-selectinas e integrina  $\beta$ -1 (HIROSE et al., 2001; KAWASHIMA et al., 2002; KAWASHIMA et al., 2000; KIM et al., 2009; TAYLOR e GALLO, 2006; WANG et al., 2009; WU et al., 2002; ZHENG et al., 2004; GENBACEV et al., 2003, WU et al., 2003) e fornece sinais intrínsecos que podem influenciar o sistema imunológico e um fenótipo celular inflamatório (WIGHT et al., 2014).

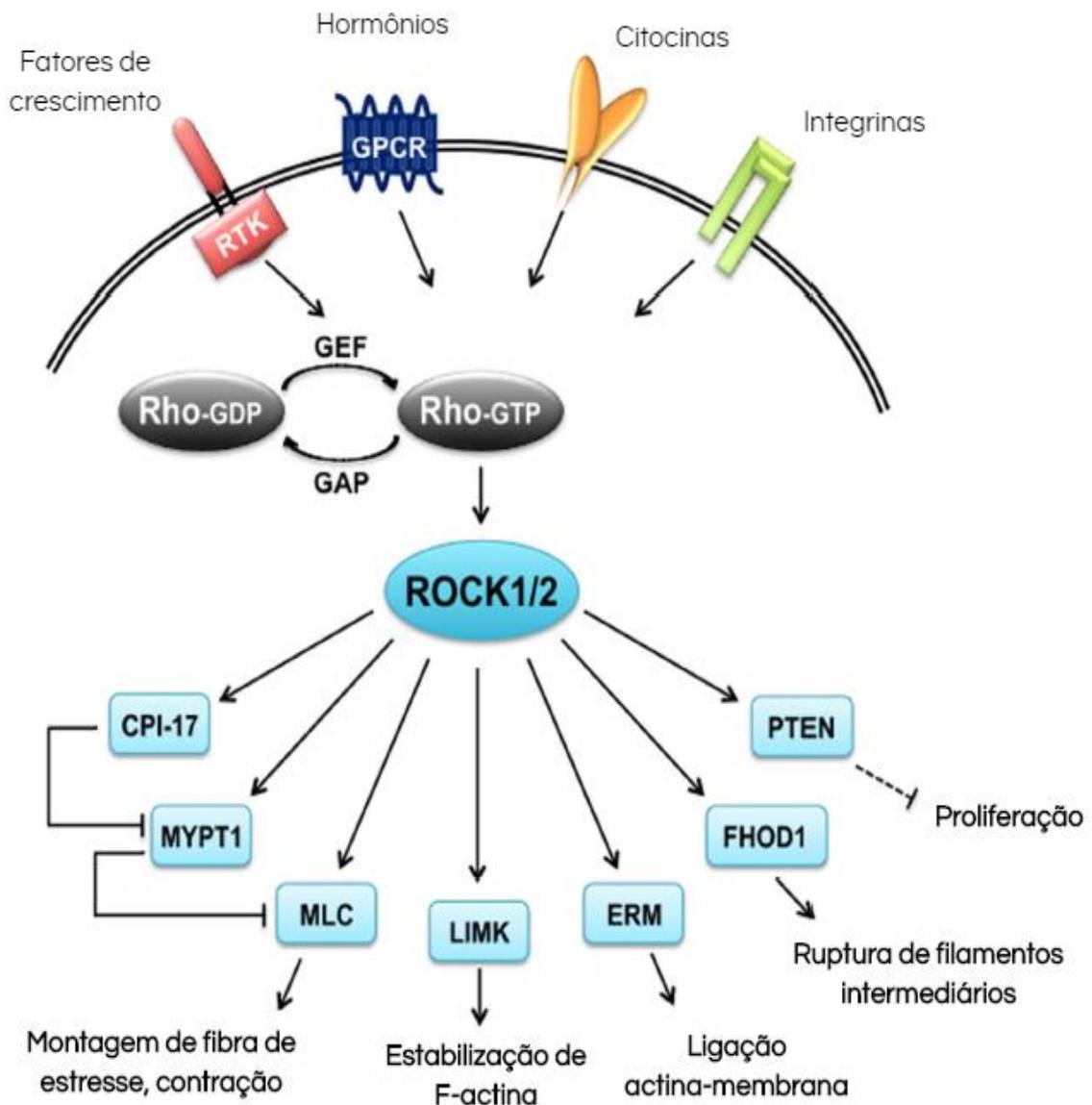
Macromoléculas tais como versicam e o ácido hialurônico podem influenciar um fenótipo que facilite a tumorigênese através da sinalização com receptores de superfície celular. Por exemplo, o versicam através dos domínios do EGF-R e integrina  $\beta$ 1 (ZHENG et al., 2004; SHENG et al., 2005; WU et al., 2002) ou o ácido hialurônico através do receptor

CD44 (HAMILTON et al., 2007). Esta hipótese é fundamentada por estudos que mostram que uma regulação negativa promovida por siRNA de versicam leva a uma redução correspondente dos receptores CD44 (HAVRE et al., 2013), enquanto que uma regulação positiva de versicam leva a um aumento correspondente em CD44, metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9), e receptor para motilidade mediada pelo ácido hialurônico (YEUNG et al., 2013). Além disso, uma expressão aumentada do domínio G3 de versicam em células de astrocitoma está associada ao aumento dos tumores (ZHENG et al., 2004). Este efeito é atribuído à modulação da sinalização celular através do receptor EGF via interações com o domínio G3 de VCAN. Assim como é conhecido que o versicam se liga ao ácido hialurônico presente na MEC adjacente através de seu domínio G1, reduzindo a adesão (LEBARON et al., 1992; HERNÁNDEZ et al., 2011); outros estudos demonstraram que o versicam se liga através de seu domínio C-terminal à integrina  $\beta 1$ , ativando a proteína de adesão focal (FAK), promovendo a adesão celular e favorecendo a proteção das células contra a apoptose induzida por radicais livres (WU et al., 2002).

Uma hipótese considerável para o aumento da expressão versicam em muitos tipos de neoplasias é de que a interação do ácido hialurônico com seu receptor CD44 aumenta a expressão de versicam. O receptor CD44 tem sido demonstrado como regulador da migração celular em células de câncer de cólon humano por meio da Lyn quinase e fosforilação de AKT (proteína quinase B) (SUBRAMANIAM et al., 2007), e a fosforilação de AKT está ligada à ativação de GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenina (GSK-3 $\beta$ , quinase de síntese de glicogênio 3 beta) (RAHMANI et al., 2006). Isso é considerável, uma vez que a expressão de versicam é em grande parte conduzida pela via AKT / GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenina (RAHMANI et al., 2006). A ativação do eixo de sinalização CD44 / AKT pelo ácido hialurônico pericelular poderia explicar a expressão aumentada do versicam observado em muitos tipos de câncer, como o leiomiossarcoma, por exemplo (KEIRE et al., 2014). Outra possível via de sinalização para a ação de VCAN é em relação ao IL-17A, uma importante citocina pró-inflamatória para acelerar a progressão do carcinoma epidermóide de língua. A elevação dos níveis de IL-17A promove a migração e invasão de células do carcinoma epidermóide de língua através da modulação da expressão de miR-23b / versicam (WEI et al., 2017).

Todos esses receptores de VCAN influenciam a via de sinalização Rho-GTP/ROCK, uma via essencial em eventos celulares como proliferação, migração, fagocitose, polimerização de microtúbulos, adesão e organização de citoesqueleto, por exemplo (Fig. 3) (HARTMAN et al., 2015), que também é ativada durante a gestação (DOMOKOS et al., 2017; Friel et al., 2005) e é primordial para a invasão das células trofoblásticas durante a

implantação e o estabelecimento da placenta (SHIOKAWA et al., 2002; ALARCON e MIRIKAWA, 2018). E em um contexto de progressão tumoral, o versicam é capaz de ativar diferentes tipos de células inflamatórias através do receptor *Toll-like 2* (TLR-2) e, em seguida, promover a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6, promovendo fortemente a progressão do tumor (KIM et al., 2009). Além disso, células inflamatórias e neoplásicas aumentam a expressão de versicam, que por sua vez induz uma cascata de secreção de citocinas inflamatórias a gerar um microambiente inflamatório que fornece a progressão tumoral e metástases (GAO et al., 2012).



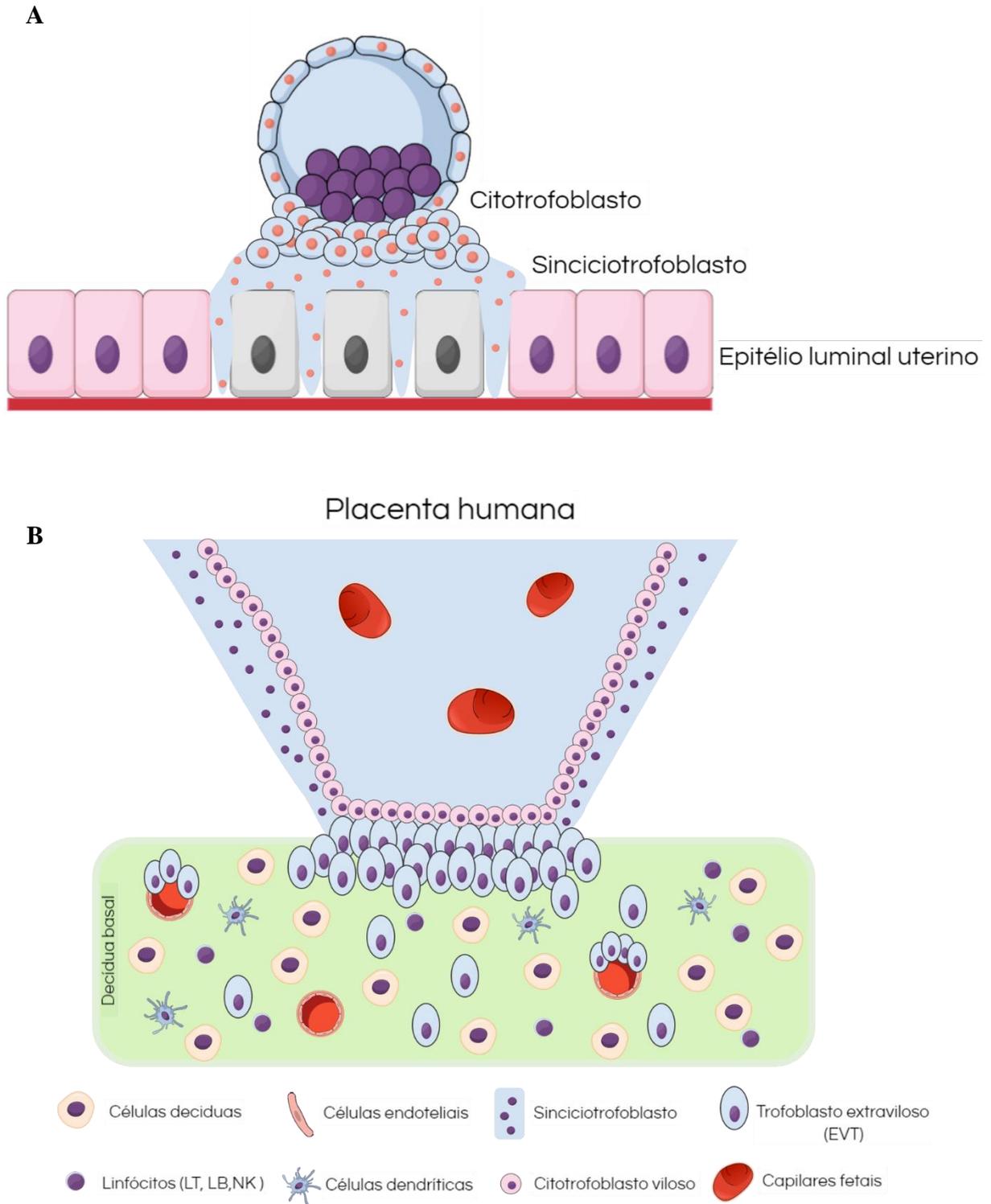
**Figura 3. Representação da via de sinalização Rho-GTP/ROCK.** Fonte: Adaptado de Hartmann e colaboradores (2015).

#### 2.4. Placentação e Interação Materno-Fetal

No desenvolvimento embrionário, durante a implantação do blastocisto (que se inicia no fim da primeira semana e se completa no final da segunda semana), o trofoblasto - camada externa que reveste o embrião - se diferencia em: sinciciotrofoblasto, estrutura que invade o endométrio; e citotrofoblasto, formado por células que sofrem mitose para abastecer o sinciciotrofoblasto (Fig. 4).

Fisiologicamente, o sinciciotrofoblasto penetra no endométrio e dá início à formação das vilosidades coriônicas, onde acontecem as trocas gasosas e de nutrientes entre o sangue materno e o fetal. Grande parte das vilosidades coriônicas é flutuante e possui contato com o sangue materno presente no espaço interviloso, enquanto as vilosidades de ancoragem permanecem aderidas à decídua basal através da proliferação do citotrofoblasto, o qual extravasa os limites da vilosidade coriônica, diferenciando-se em células do citotrofoblasto extraviloso (EVT). Essas células EVT possuem um fenótipo proliferativo e invasivo (BOYD, HAMILTON, 1970), invadindo a decídua basal e as artérias espiraladas uterinas, modulando sua estrutura e propriedades funcionais (KAUFMANN, CASTELUCCI, 1997; KEMP et al., 2002; LOREGGER et al., 2003). As células EVT ainda produzem e secretam o fibrinóide do tipo matriz, um tipo de MEC de composição e polaridade diferentes de outras MEC secretadas no corpo humano (KEMP et al., 2002).

Na região materna da placenta normal, além das células EVT derivadas do feto, numerosas células, sejam elas imunológicas ou decíduais, estão presentes para formar a estrutura da decídua basal. A decídua é uma plataforma transitória que compreende células do estroma endometrial terminalmente diferenciadas em células decíduais, células vasculares maternas recém-geradas e grande variedade e concentração de leucócitos. O desenvolvimento da decídua após a fixação do blastocisto na parede uterina é uma remodelação de tecido drástica, envolvendo alterações físicas e humorais nas células imunes residenciais e recrutadas (MORI et al., 2016). Tal processo é denominado decidualização e em humanos acontece na fase secretora tardia do ciclo menstrual por influência da progesterona, embora a diferenciação alcance seu ápice na gestação (SALOMONSEN et al, 2003).



**Figura 4. Interface materno-fetal.** Implantação embrionária (A) e placenta madura de primeiro trimestre de gestação (B).

A placenta humana é única em muitos aspectos do seu crescimento e diferenciação, sendo que seu desenvolvimento depende da proliferação, diferenciação e invasão celular (GENBACEV et al., 2000). Em especial sob o ponto de vista imunológico, acredita-se que as células imunológicas que residem na interface materno-fetal desempenham muitos papéis importantes na gravidez. Além disso, durante a gestação é desenvolvida uma modulação imunológica na interface materno-fetal crucial para garantir que o feto não seja rejeitado (CHEN et al., 2011).

Os constituintes leucocitários da interface materno-fetal são no primeiro trimestre as células NK uterinas (~ 70%) e macrófagos (~ 20%) (TRUNDLEY e MOFFETT, 2004; BULMER et al., 2010). As proporções de linfócitos T são mais variáveis (~10-20%) e células dendríticas, linfócitos B e linfócitos NKT são consideradas populações raras nesse contexto (ERLEBACHER, 2013).

A respeito das células NK, como maior população de leucócitos no estroma uterino durante o início da gestação, usualmente distinguem-se por atividades funcionais, como uma notável citotoxicidade celular dependente de anticorpos (CROUSE et al., 2014). Uma característica adicional e crítica das células NK é sua propensão a matar células com níveis anormalmente baixos de HLA (antígeno leucocitário humano, do inglês, human leukocyte antigen) de classe I expresso em suas superfícies (KARRE et al., 1986; STORKUS et al., 1989). As células NK respondem à perda do MHC (complexo principal de histocompatibilidade) de classe I (uma consequência frequente resultante de infecção viral e transformação tumoral maligna), essa funcionalidade foi descrita como o reconhecimento das células NK pela "perda do próprio" (LJUNGGREN et al., 1990).

Três tipos de receptores inibidores de células NK humanas reconhecem diferentes características do HLA de classe I. Uma interação altamente conservada é a existente entre o HLA-E e o CD94/NKG2A (SULLIVAN et al., 2008). Também é conservado o LILRB1, receptor leucocitário tipo imunoglobulina 1, (do inglês, leukocyte Ig-like receptor 1), que se liga a um epítipo transportado por uma ampla variedade de HLA de classe I. No entanto, LILRB1 tem maior afeição para o HLA-G (SHIROISHI et al., 2003), que entre células humanas saudáveis é expressa apenas por células citotrofoblásticas (KOVATZ et al., 1990). A ligação aos determinantes polimórficos de HLA-A, B e C, que são os receptores tipo imunoglobulina "killer-cell immunoglobulin-like receptors" (KIR) das células NK tem fundamental contribuição para a imunogenética da placentação humana (MOFFETT e LOKE, 2006).

Células do trofoblasto extraviloso humano também são capazes de expressar HLA-C, que é menos polimórfico do que o HLA-A ou o HLA-B, mas que possui grande semelhança estrutural com o HLA-G. O papel funcional do HLA-C na interface materno-fetal é discutido nas mesmas linhas do HLA-G, incluindo as interações com células NK uterinas. No entanto, há evidências suficientes de que as células NK uterinas, de fato, detectam moléculas HLA-C, HLA-G e HLA-E de células EVT e reagem com um perfil de citocinas, que modula as propriedades invasivas dessas células trofoblásticas (BENIRSCHKE et al., 2006).

#### 2.4.1 Invasão Trofoblástica

A invasão trofoblástica que acontece durante o desenvolvimento placentário ajuda a estabelecer uma troca fisiológica eficiente entre os sistemas circulatórios materno e fetal. As células-tronco trofoblásticas diferenciam-se em múltiplos subtipos, incluindo alguns altamente invasivos. A sinalização das células trofoblásticas para a decídua, das células NK uterinas e do músculo liso vascular pode regular a diferenciação das células EVT (KNÖFLER et al., 2008).

Durante as primeiras vinte semanas da gravidez humana, essas células colonizam a decídua e remodelam as artérias espirais uterinas até o primeiro terço do miométrio. Esse processo leva a uma vasodilatação irreversível, assegurando que o fluxo sanguíneo máximo seja entregue à interface materno-fetal a uma velocidade ideal para a troca de nutrientes (PIJNENBORG et al., 2006). O remodelamento inadequado ou incompleto é caracterizado por uma invasão trofoblástica superficial e esta condição é associada ao aborto espontâneo no segundo trimestre (BALL et al., 2006), pré-eclâmpsia (KADYROV et al., 2003), prematuridade (KIM et al., 2003) e alguns casos de restrição do crescimento fetal (KHONG et al., 1986). Em contrapartida, uma invasão excessiva por parte das células EVT pode promover o surgimento AIP, também conhecida como placenta acreta. Estas doenças não só aumentam o risco de morbidade e mortalidade na gravidez, mas também têm consequências a longo prazo para a saúde da mãe e da criança.

Como os leucócitos são abundantemente distribuídos pela decídua humana, eles têm sido implicados como mediadores essenciais da remodelação de artérias espiraladas uterinas em camundongos (GREENWOOD et al., 2000). Em humanos, as células NK uterinas CD56<sup>+</sup> e macrófagos CD68<sup>+</sup> são ausentes nas artérias espiraladas uterinas não remodeladas por células EVT, mas acumularam-se significativamente nas paredes dos vasos altamente remodelados (SMITH et al., 2009). Como tanto as células NK uterinas como os macrófagos

produzem uma variedade de proteases, incluindo metaloproteinase de matriz-7 (MMP-7) e MMP-9 (SMITH et al., 2009), é possível que o catabolismo mediado por leucócitos da matriz extracelular vascular seja, em parte, responsável pela dilatação arterial durante a invasão das células EVT, facilitando o acesso de células invasoras (HARRIS et al., 2010).

Os eventos gênicos e biológicos associados aos mecanismos de invasão das células EVT tem sido comumente comparado aos de células neoplásicas (CORVINUS et al., 2003). Entretanto, a diferença é que o processo de invasão das células EVT é controlado fisiologicamente ao longo da gestação. No rol de fatores envolvidos nesta regulação estão incluídos inúmeros fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas, proteoglicanos e outros componentes da matriz extracelular (WALLACE et al., 2012). O fibrinoide do tipo matriz, produzido pelas células EVT, é constituído por componentes da lâmina basal, acumulados e modificados de uma maneira não polarizada no entorno de suas células, principalmente colágeno IV e lamininas (FRANK et al., 1994; HUPPERTZ et al., 1996).

Com a transição fenotípica das células EVT proliferativas em invasivas, ocorrem mudanças na expressão de moléculas de comunicação celular como E-caderinas e conexinas (WINTERHAGER et al., 2000), nos tipos de lamininas (KEMP et al., 2002) e na expressão diferencial de metaloproteinases (MMPs) (HUPPERTZ et al., 1997). Alterações nos processos de migração e invasão do EVT são preocupantes durante a gestação por serem causa de doenças que representam risco de morte materna e fetal; como é o caso da placenta anormalmente invasiva.

Uma das causas da placenta anormalmente invasiva é uma decidualização ausente ou deficiente devido a implantação embrionária no local de uma cicatriz de cirurgia cesárea prévia (KHONG et al., 2008). O momento da implantação do blastocisto envolve uma série de eventos complexos, quando se cria uma conexão entre os tecidos maternos e embrionários. Durante a implantação e invasão das células EVT, as células estromais endometriais passam por uma sequência de transformações, envolvendo alterações físicas e hormonais, por influência constante de progesterona (SALOMONSEN et al., 2003; MORI et al., 2016). A decidualização é definida como a transformação epitelióide das células estromais endometriais em células deciduais altamente especializadas com funções distintas (SHARMA e GODBOLE, 2016). É sugerido que as secreções deciduais alteram a expressão de integrinas e outras moléculas na superfície celular que estão envolvidas nas interações célula-célula do trofoblasto. Tais alterações alterariam propriedades adesivas e permitiriam que as células EVT fizessem novas ligações com células endoteliais das artérias espiraladas uterinas e

células imunes, permitindo a remodelação da interface materno-fetal (SHARMA e GODBOLE, 2016).

As células decíduais produzem uma variedade de citocinas e fatores de crescimento que podem ser estimuladores da invasão celular, tais como a IL-1 $\beta$  (LIBRACH et al., 1994; PRUTSCH et al., 2012), IL-6 (JOVANOVIC et al., 2009; DOMINGUEZ et al., 2008), IL-8 (DE OLIVEIRA et al., 2010; Jovanovic et al., 2010), IL-11 (PAIVA et al., 2007; SUMAN et al., 2012), IL-15 (ZYGMUNT et al., 1998) e CCL-5 (FUJIWARA et al., 2005; THIRKILL et al., 2005); ou inibidores da invasão das células EVT, tais como IL-10 (ROTH et al., 1999; YAMAMOTO-TABATA et al., 2004) e IL-12 (KARMAKAR et al., 2004). Além de citocinas e quimiocinas, as células decíduais são conhecidas por produzir moléculas de MEC com propriedade regulatórias de invasão das células EVT, como glicoproteínas adesivas e proteoglicanos (BORBELY et al., 2013; LALA e GRAHAM, 1990; ZORN et al. 1995; ZORN et al., 1986).

Esses fatores regulam a atividade de proteases, a expressão de integrinas (JOVANOVIC et al., 2009; JOVANOVIC et al., 2010), além de controlar atividades de MMPs, produzidas pelo EVT para atingir um grande potencial invasivo e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (LALA e GRAHAM, 1990; BURROWS et al., 1996). Isso pode ser essencial para o controle do microambiente onde acontece a invasão trofoblástica (KNÖFLER et al., 2007). Nesse contexto, durante a gestação, a decídua funciona como um dos mecanismos de equilíbrio na produção dessas moléculas pró e anti-invasivas, e essa produção controla e regula o processo de invasão das células trofoblásticas (SHARMA e GODBOLE, 2016).

### 3 OBJETIVOS

Diante do exposto, o principal objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do silenciamento gênico do versicam em alguns processos celulares em linhagem de célula trofoblástica humana equivalente a células EVT de primeiro trimestre de gestação.

Especificamente pretendemos:

- Verificar se as células da linhagem HTR-8/SVneo expressam versicam e se essa expressão pode ser utilizada como um modelo celular para o estudo do silenciamento gênico do mesmo;
- Analisar se o silenciamento gênico do versicam influencia na morte celular de células da linhagem HTR-8/SVneo;
- Verificar se o silenciamento gênico do versicam influencia na proliferação e ciclo celular de células da linhagem HTR-8/SVneo;
- Analisar se o silenciamento gênico do versicam influencia na migração celular de células da linhagem HTR-8/SVneo;
- Analisar se o silenciamento gênico do versicam influencia na expressão e organização citoesqueleto de F-actina de células da linhagem HTR-8/SVneo.
- Analisar se o silenciamento gênico do versicam influencia na expressão e organização citoesqueleto de F-actina de células da linhagem HTR-8/SVneo.
- Analisar se o silenciamento gênico do versicam influencia sinalização RhoA-GTP/pROCK2 de células da linhagem HTR-8/SVneo.

## 4 METODOLOGIA

O presente trabalho foi elaborado de acordo com o manual Padrão UFAL de Normalização para elaboração de trabalhos acadêmicos (EDUFAL, 2013).

### 4.1 Cultura de células

Para a realização dos experimentos, foi utilizada a linhagem celular HTR-8/SVneo, uma linhagem de células trofoblásticas de primeiro trimestre de gestação. As células foram mantidas em estufa à 37 °C com 5% de dióxido de carbono, em garrafas próprias para cultivo celular. A cultura de células foi mantida em meio DMEM/F12 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) suplementado, o qual foi composto de 10% de soro bovino fetal (SBF) (Sigma) e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina, gentamicina) e anfotericina B (Sigma). Todos os experimentos foram realizados utilizando linhagem celular até a vigésima passagem, sendo cada passagem realizada após as células alcançarem 80% de confluência.

### 4.2 Silenciamento gênico para o versicam

Para o silenciamento gênico do versicam em células HTR-8/SVneo, foram plaqueadas  $2 \times 10^5$  células/poço na presença de meio DMEM/F12 suplementado. O silenciamento gênico foi realizado utilizando *kit* de transfecção de RNA de silenciamento (siRNA; Santa Cruz, Los Angeles, CA, EUA) conforme instruções do fabricante (figura 6). O experimento consistiu dos seguintes passos: após aderidas, as células foram lavadas com solução tampão fosfato salina (PBS) estéril (Sigma) e deixadas em meio de cultivo puro durante 24h. Posteriormente, as células foram incubadas por 5h à 37°C, com solução preparada previamente contendo o siRNA com sequência de interferência para versicam ou com sequência controle “*scramble*”, reagente de transfecção e meio de transfecção próprios do *kit* seguindo os seguintes passos de preparação das soluções e etapas:

1º) Foi realizado o preparo das soluções:

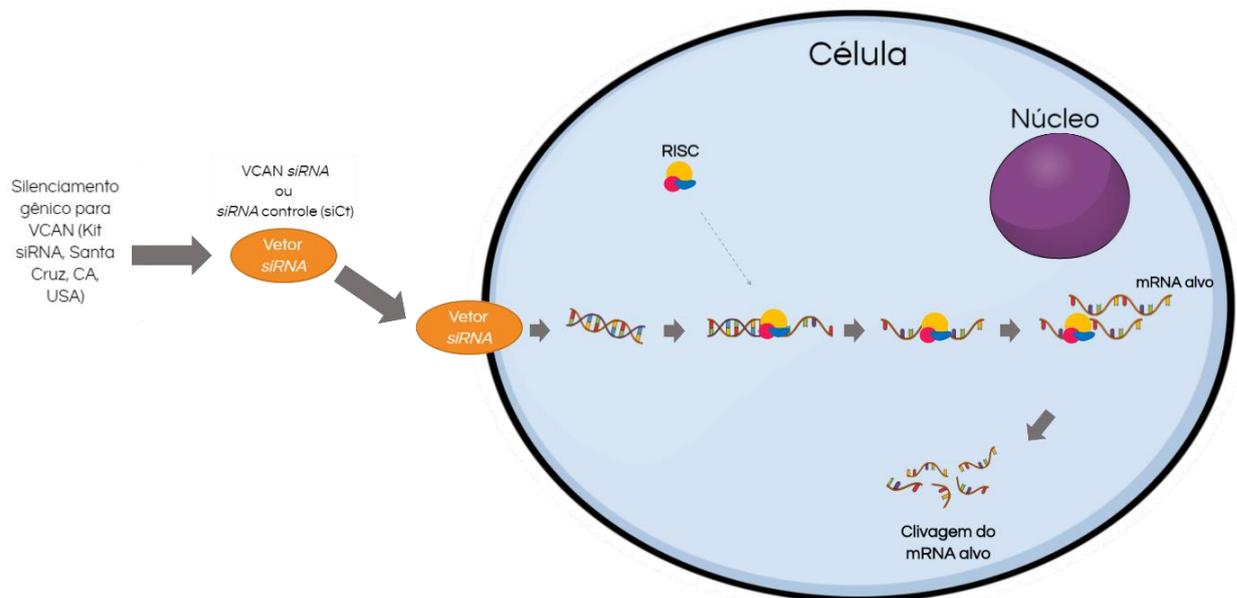
Solução A – 5 µL (0,6 µg) de siRNA versicam ou controle “*scramble*” + 100 µL de meio de transfecção;

Solução B – 5 µL (0,6 µg) de reagente de transfecção + 100 µL de meio de transfecção;

2º) Em seguida foram adicionados 105 µL da solução B na solução A e misturado gentilmente. Na sequência essa mistura foi deixada incubando em temperatura ambiente durante 30 minutos.

3º) As células plaqueadas foram lavadas com PBS estéril. E em seguida foram adicionados 800 µL do meio de transfecção na solução A e foi feita homogeneização.

Foi adicionado 350µL dessa mistura por poço, em placas de 24 poços. Em seguida, as células foram incubadas com meio DMEM/F12 com aditivos em dobro por 18h à 37°C. Para verificar a eficácia do método, foram realizadas técnicas de reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR), imunofluorescência e citometria de fluxo.



**Figura 5. Ação do silenciamento gênico na célula.** O siRNA entra na célula via vetor de lipofectamina; O siRNA liga-se a RISC (complexo silenciador induzido por RNA); as cadeias de siRNA são separadas; o complexo siRNA / RISC associa-se ao mRNA alvo e cliva-o. siRNA – RNA de interferência; siCt – RNA de interferência controle; mRNA – RNA mensageiro. Fonte: adaptado de Santa Cruz Biothecnology, disponível em < <https://www.scbt.com/scbt/pt/whats-new/gene-silencers> >.

#### 4.3 Marcação para faloidina e imunofluorescência

Para análise dos efeitos do silenciamento gênico de versicam no citoesqueleto de actina, as células HTR-8/SVneo foram coradas com faloidina conjugada com FITC (Sigma) 1:50 em PBS após permeabilização com 0,5% de Triton X-100 em PBS. Após o período de permeabilização, as células foram incubadas com DAP-I (DAPI; 1:1000 em PBS; Sigma-Aldrich) e logo após realizada imunofluorescência para versicam, a ser descrita adiante, e montadas em PBS/glicerol (1:3) para a análise das células sob microscopia de fluorescência.

Para análise qualitativa da expressão de versicam após o silenciamento gênico e para análise do seu efeito na proliferação celular foi realizado ensaio de imunofluorescência. Para isso, as células cultivadas foram fixadas em álcool metílico a – 20° C durante 20 minutos.

Posteriormente, as células foram incubadas em gelatina de pele de peixe a 0,05% (Sigma) em PBS por 1 hora e, logo após, em PBS contendo 3% de glicina por 1 hora, para bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo primário fabricado em coelho, anti-versicam (1:250) (doado gentilmente pelo Dr. Larry Fisher do *National Institute of Dental and Craniofacial Research/ National Institutes of Health* (NIDCR/NIH, EUA), e anticorpos primários, produzidos em camundongo Ki-67 (1:100) (Santa Cruz) ou pFAK (1:1000) (Cell Signaling, Danvers, MA, EUA), *overnight* a 4 °C. Após isso, as células foram lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugado com fluoresceína isotiocianeto (FITC) ou isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) (Sigma) ou anti-camundongo conjugado com FITC (1:200) ou TRITC (1:200) (Sigma) durante 1 hora em temperatura ambiente. Os núcleos celulares foram corados com 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI; 1:1000 em PBS; Sigma-Aldrich) e PBS/glicerol (1:3) foi meio utilizado como meio de montagem em lamínula.

As células positivas para Ki-67 foram contadas e analisadas digitalmente a partir de 15 fotomicrografias por experimento. A taxa de proliferação celular foi calculada pela comparação da quantidade de células, entre o grupo controle e o grupo silenciado para versicam.

Para os experimentos para detecção de versicam, marcação para faloidina e Ki-67, as culturas celulares foram analisadas em microscópio de fluorescência DS-Ri1 (Nikon, Japão) e as imagens capturadas por câmera fora processadas por meio do *software* DP2-BSW (Olympus, Japão, versão 2.1) para documentação dos resultados. As quantificações de pFAK e versicam foram feitas através de imagens adquiridas em microscópio invertido de fluorescência Zeiss (Zeiss, Alemanha) equipado com *shutter* controlado pelo programa MetaMorph (Molecular Devices, CA, EUA; versão 7.8). A quantificação das imagens foi realizada por meio do *plug-in* Image Analysis Toolbox do programa ImageJ (NHI, MD, EUA; versão Java 1.8.0\_112, 64-bit).

#### 4.4 Análise da expressão de versicam e via de sinalização Rho/ROCK por citometria de fluxo

As culturas de células HTR-8/SVneo foram analisadas por citometria de fluxo, para avaliação quantitativa da expressão do versicam, RhoA-GTP e pROCK2 nas células. Para tal metodologia,  $3 \times 10^5$  células por poço foram removidas do substrato com uma solução de tripsina a 0,5%; a ação enzimática foi neutralizada com soro de cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) a 5% em PBS por 20 minutos. Após lavagens em PBS, as células foram incubadas com o kit para fixação e permeabilização (e-Bioscience, San Diego, CA,

EUA) de acordo com as instruções do fornecedor. As células foram incubadas em tampão de permeabilização com anticorpos anti-versicam (1:100), anti-RhoA-GTP (1:50) e anti-ROCK2 (1:50) previamente conjugados com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com FITC (1:200). As análises foram realizadas em citômetro de fluxo FACS Canto™ II com o programa FACSDiva (BD Biosciences). Um total de 10.000 eventos foram adquiridos por amostra. Os dados obtidos foram analisados usando o programa FlowJo versão 8.7 (BD Biosciences).

#### 4.5 Análise da morte celular por citometria de fluxo

Para a detecção de morte celular, kit de marcação para Anexina V (FITC)/Iodeto de Propídio (ficoeritrina; PE) (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) foi utilizado conforme especificações do fabricante. Resumidamente,  $1 \times 10^6$  células/poço foram removidas por tripsina (2,5g/L durante 3 minutos), em seguida a enzima foi neutralizada com SBF (Sigma) e as células foram centrifugadas a 1500 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 200  $\mu$ L de solução *binding buffer* (BD Biosciences). Em seguida foram transferidas  $1 \times 10^5$  células para tubos de citometria e adicionados 5  $\mu$ L de anexina (5:100) e 5  $\mu$ L de iodeto de propídio (PI) (5:100); as células foram vortexadas e incubadas a temperatura ambiente durante 15 minutos. Em seguida foi adicionado *binding buffer*, novamente, às amostras e as análises foram realizadas em até 1h após o experimento. As análises foram realizadas em citômetro de fluxo FACS Canto II com o programa FACSDiva (BD Biosciences). Um total de 10.000 eventos foram adquiridos por amostra. Os dados obtidos foram analisados usando o programa FlowJo versão 8.7 (BD Biosciences). Para as análises, foram consideradas células em processo de apoptose inicial (anexina V<sup>+</sup>), e células mortas por apoptose ou necrose (anexina V<sup>+</sup> e PI<sup>+</sup>).

#### 4.6 Extração de RNA e RT-PCR semi-quantitativo

O RNA total foi extraído das células plaqueadas ( $1 \times 10^6$  células/poço) utilizando Trizol® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), conforme especificações do fabricante. O RNA foi medido por espectrofotometria ultravioleta por meio de um espectrofotômetro Biochrom Libra 22S (Biochrom, UK) e o cDNA foi sintetizado a partir de 1  $\mu$ g de RNA total utilizando *kit Superscript® First Strand* (Life Technologies). O ensaio de RT-PCR foi realizado usando a enzima *Taq Polimerase* (Life technologies) e os primers utilizados foram: GAPDH, versicam V0, versicam V1, versicam V2 e versicam V3. Todas as sequências das isoformas de versicam estão de acordo com Corps e colaboradores (2004), sendo desenhadas usando *Primer Express* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As sequências foram

escolhidas para amplificar a região entre os éxons 3 e 4, a qual sofre *splicing* e se apresenta em todas as isoformas. As respectivas temperaturas de anelamento e tamanhos dos produtos de PCR foram padronizados (Tabela 3).

Os produtos de PCR foram visualizados com brometo de etídio após eletroforese em géis de agarose a 2%. As imagens foram obtidas por meio de fotodocumentador para gel de eletroforese L-PIX TOUCH (Loccus Biotecnologia, SP, Brasil).

<i>Primer</i>	<b>Sequência</b>
<b>GAPDH Forward</b>	CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT
<b>GAPDH Reverse</b>	ACCCACTCCTCCACCTTTGA
<b>Versicam V0 Forward</b>	GCACAAAATTTACCCCTGACAT
<b>Versicam V0 Reverse</b>	CTGAATCTATTGGATGACCAATTACAC
<b>Versicam V1 Forward</b>	TGAGAACCCTGTATCGTTTTGAGA
<b>Versicam V1 Reverse</b>	CTGAATCTATTGGATGACCAATTACAC
<b>Versicam V2 Forward</b>	GCACAAAATTTACCCCTGACAT
<b>Versicam V2 Reverse</b>	CGTTAAGGCACGGGTTTCATT
<b>Versicam V3 Forward</b>	TGAGAACCCTGTATCGTTTTGAGA
<b>Versicam V3 Reverse</b>	CGTTAAGGCACGGGTTTCATT

**Tabela 2.** Sequências de *primers* para mRNA de GAPDH e isoformas de versicam

#### 4.7 Detecção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA) e de citometria por *beads*

Após o experimento de silenciamento gênico de versicam, os sobrenadantes das células HTR-8/SVneo foram avaliados pelo kit LEGENDplex Human Th1/Th2 Panel (BioLegend, San Diego, CA, EUA) quanto a presença das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e o kit CBA Th1/Th2 (BD Biosciences) para as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL12p70 e TNF, ambos realizados conforme especificações dos fabricantes. Resumidamente, Para detecção das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , placas de 96 poços Maxisorp (Costar) foram sensibilizadas com 100  $\mu$ L/poço do anticorpo de captura, para cada citocina,

diluídos em PBS e mantidas overnight à temperatura ambiente. Após este período foram realizadas 4 lavagens com 300 µL/poço de tampão de lavagem (0,05% de Tween 20 em PBS). Em seguida as placas foram bloqueadas com 300 µL/poço de tampão de bloqueio (1% de albumina de soro bovino - BSA - em PBS) por 1 hora a temperatura ambiente. Novamente após 4 lavagens, as amostras e a curva-padrão foram incubadas por um período de 2 horas à temperatura ambiente. Para a curva-padrão, as citocinas recombinantes foram realizadas em diluições seriadas (fator 2 de diluição), conforme recomendações do fabricante. Ambas as amostras e as curvas padrões foram realizadas em duplicata com 100 µL/poço. Em seguida, foram feitas 4 novas lavagens e adicionados 100 µL/poço de anticorpo de detecção em tampão diluente (0,1% de BSA em PBS + 0,05% de Tween 20) e estreptoavidina seguido de incubação por 30 minutos, no escuro, à temperatura ambiente.

Após esse período foram realizadas 4 lavagens. Em seguida, 100µL/ poço de substrato (tetrametilbenzidina; BD Biosciences, EUA) foram adicionados e incubados por 20 minutos, no escuro, em temperatura ambiente. Por fim, 100µL/ poço de HCl (1M) foram adicionados para interromper a reação e a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro com filtro de 450 nm.

Para a metodologia do kit CBA, os sobrenadantes e os padrões de citocinas do kit foram incubados com microesferas de captura de dois tamanhos e níveis diferentes de fluorescência e recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas e com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE). Após as incubações de 2 horas em constante agitação, no escuro e à temperatura ambiente, foi adicionado estreptoavidina-ficoeritrina (SA-PE) o qual se liga aos anticorpos de detecção biotinilados, fornecendo sinal fluorescente com intensidades em proporção à quantidade de analito ligado. Após esse período a solução de lavagem foi adicionada e o material centrifugado duas vezes por 10 minutos a 300 g. Por fim a detecção das citocinas foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto™II equipado com o programa de computador Diva (BD Bioscience), após a aquisição de 3.000 microesferas.

Os resultados da citometria de fluxo foram convertidos para a secreção de pg/mL usando os programas BioLegend LEGENDplex (BioLegend) e FlowJo (TreeStar Inc, Ashland, OR, EUA).

#### 4.8 Ensaio de proliferação e ciclo celular por meio da análise de Ki-67.

Para as análises de ciclo celular, as células positivas para Ki-67 foram categorizadas nas diferentes fases do ciclo celular, segundo Raynov e colaboradores (2005). O processo de análise consistiu na verificação dos padrões de marcação para Ki-67 nas células. Durante as

fases G1-G2, o Ki-67 está disposto de maneira densa do núcleo, bem como nas regiões teloméricas e centroméricas dos cromossomos. Progredindo para a fase S e a interfase, quando é possível registrar uma marcação intensa predominantemente nos nucléolos, bem como em pequenas áreas nucleoplásmicas dispersas. A condensação cromossômica durante a prófase e metáfase é registrada por meio de uma marcação nuclear positiva mais intensa nas células. E durante a anáfase e a telófase, a intensidade da marcação para Ki-67 começa a diminuir e desaparecer em G0.

#### 4.9 Ensaios de motilidade

Para análise da motilidade, duas técnicas foram utilizadas: os ensaios de ferida e de videomicroscopia por *time-lapse* para obtermos dados de migração celular.

##### 4.9.1 Ensaio de ferida *in vitro*

O ensaio de ferida *in vitro* foi realizado após o plaqueamento das células em placas de 24 poços até atingirem confluência. Em seguida, foi realizada uma lacuna na monocamada, através da delicada passagem de ponteira de pipeta de 200 µL sobre a mesma. Pontos de referência foram demarcados no fundo de cada placa para auxiliar na obtenção de fotomicrografias nos períodos de 0, 24, 48 e 72h (em aumento de 40x). Após a obtenção das imagens, os espaços na monocamada foram mensurados utilizando programa ImageJ. Para obtenção da porcentagem de fechamento da ferida *in vitro* em cada tempo avaliado, foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{Porcentagem de fechamento da lacuna} = \frac{\text{Área tempo inicial} - \text{Área tempo final}}{\text{Área tempo final}} \times 100$$

##### 4.9.2 Ensaio de videomicroscopia *Time-lapse*

O ensaio de videomicroscopia *time-lapse* foi realizado a partir de ensaios de ferida no Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade de São Paulo, por colaboração com a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vanessa Morais Freitas. Resumidamente, após 24 horas da realização do silenciamento gênico de VCAN, foram realizadas 17 horas de imagens de cada grupo de células, sendo uma foto obtida a cada 20 minutos. A análise dos vídeos foi realizada, sendo avaliadas 10 células por vídeo, cada vídeo contendo 80 frames.

As imagens foram adquiridas em microscópio invertido de fluorescência Zeiss equipado com shutter controlado pelo programa MetaMorph, câmara resfriada, incubadora com temperatura controlada e injetor de gás carbônico (Zeiss, Alemanha). A partir disso, foi avaliada a velocidade celular em mm/minuto através de medidas *frame a frame* através do *plug-in* MTrackJ do programa ImageJ.

#### 4.9.3 Ensaio de invasão em fibronectina

Para outro ensaio de motilidade, as células HTR-8/SVneo foram plaqueadas ( $0,25 \times 10^5$  células/poço) em câmaras bipartites do tipo *Transwell* (BD Biosciences) de poros de 8  $\mu\text{m}$  (Millicell, Millipore) revestidas com fibronectina (1:1 em PBS) e 300  $\mu\text{L}$  e 250  $\mu\text{L}$  de meio DMEM/F12 sem soro foram adicionados nos compartimentos inferior e superior, respectivamente. Após a adesão das células, foi realizado o protocolo de silenciamento gênico para versicam, por 24 h a 37 °C. Após isso as células foram lavadas com PBS, fixadas em álcool metílico, lavadas novamente e incubadas com DAPI por 10 min, em temperatura ambiente. As células presentes na face superior do inserto foram gentilmente retiradas com o uso de um cotonete e as membranas cortadas com o auxílio de um bisturi, sendo montadas com PBS/glicerol (1:3) em lamínulas. Foi realizado ensaio de imunofluorescência para versicam, e as células positivas para esta proteína e presentes em cinco campos de cada membrana foram contadas e analisadas digitalmente. A porcentagem de invasão foi calculada através da comparação da quantidade de células nas membranas controles e nas silenciadas.

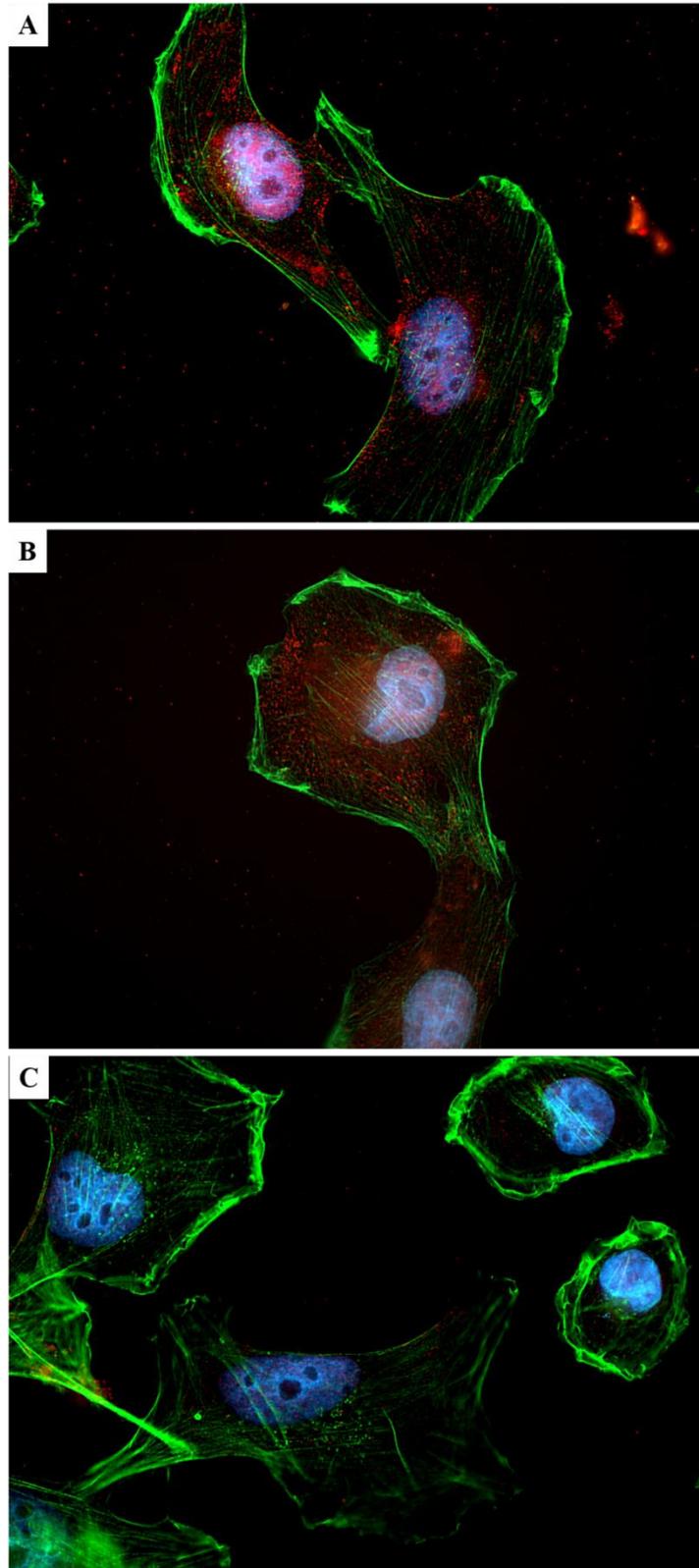
#### 4.10 Análises Estatísticas

A análise estatística foi realizada por meio de testes comparativos múltiplos Student-Newman-Keuls utilizando o programa Prism® (GraphPad; San Diego, CA, EUA). A distribuição de Gauss e a igualdade das variâncias foram examinadas pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Levene, respectivamente. Valores estatisticamente significantes foram considerados quando  $p < 0,05$ .

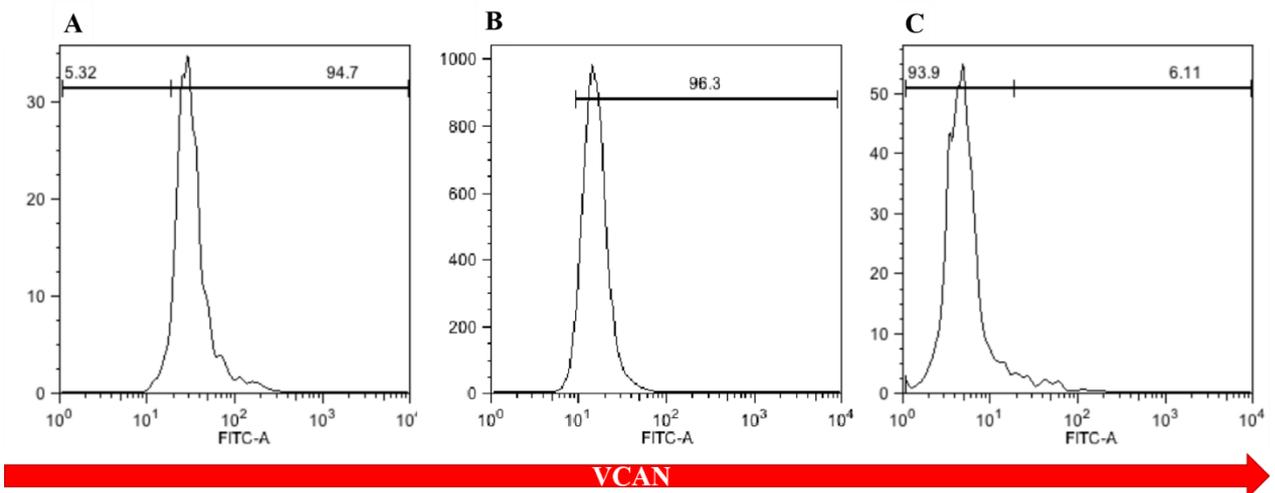
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Expressão de versicam e eficiência do silenciamento gênico para versicam em células HTR-8/SVneo

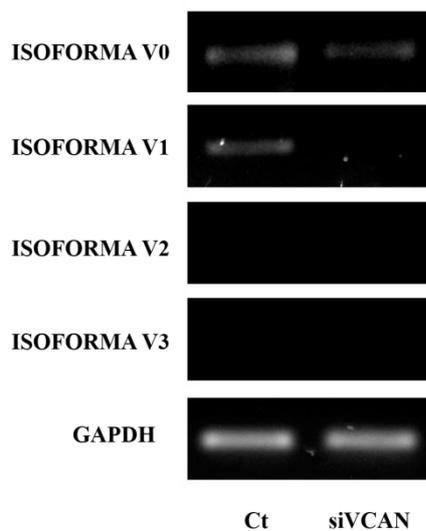
A fim de compreender quais são as funções do versicam em determinados eventos celulares, tais como morte, proliferação, migração, velocidade adesão e invasão, por exemplo, foi realizado procedimento de silenciamento gênico por siRNA, tendo como alvo este proteoglicano em células da linhagem HTR-8/SVneo, conhecidas pela notável capacidade invasiva e migratória. A eficácia do silenciamento gênico para VCAN pode ser comprovada qualitativamente e quantitativamente por meio de imunofluorescência, RT-PCR e citometria de fluxo, respectivamente. Por meio da imunofluorescência foi possível visualizar um padrão de localização da proteína versicam de maneira homogênea entre as células do grupo controle, em forma de grânulos citoplasmáticos (Fig. 6 A). O controle *scramble* do experimento manteve o padrão de expressão de VCAN, assim como o padrão de organização dos filamentos de actina presentes nos contornos celulares (Fig. 6 B). O silenciamento gênico para VCAN foi eficaz, como evidenciado pela acentuada redução dos níveis proteicos de versicam, além da redução da polarização dos filamentos de actina, deixando-os mais presentes e condensados na periferia celular (Fig. 6 C). Quantitativamente, o grupo controle apresentou 94,7% dos níveis relativos da proteína de versicam, enquanto o grupo silenciado apresentou 6,11%, demonstrando um silenciamento gênico altamente eficiente. Nas análises de citometria de fluxo, o controle *scramble* do experimento manteve o padrão de expressão de VCAN encontrado nos grupos controle (Fig. 7 A-C). Da mesma forma, a análise por RT-PCR mostrou que as células do grupo controle expressam os mRNA das isoformas V0 e V1 (Fig. 8). Essa expressão de mRNA de versicam foi reduzida eficientemente após o silenciamento gênico, realizado por meio de siRNA para esta molécula (Fig. 10).



**Figura 6. Níveis celulares da proteína versicam em HTR-8/SVneo.** A - Imunofluorescência em células HTR-8/SVneo controle; B - Imunofluorescência em células HTR-8/SVneo do grupo *scramble*; C - Imunofluorescência em células HTR-8/SVneo após 24h de silenciamento. (Ampliação 100x). Verde – Faloidina; Vermelho – Marcação para versicam; Azul - DAP-I.



**Figura 7. Análise da expressão proteica de versicam por citometria de fluxo em HTR-8/SVneo.** A – Controle; B – Grupo *scramble*; C – células HTR-8/SVneo após 24h de silenciamento gênico.



**Figura 8. Expressão gênica de versicam em HTR-8/SVneo.** Níveis relativos de mRNA das isoformas de VCAN por RT-PCR em células HTR-8/SVneo controles (Ct) e após 24h do silenciamento gênico (siVCAN).

### 5.2 Efeitos do silenciamento gênico de versicam na viabilidade celular

Por meio de citometria de fluxo para anexina V e iodeto de propídio (PI), ambos marcadores de morte celular, foi avaliada a influência do silenciamento gênico de versicam nas taxas de morte das células. Os resultados obtidos apontam que o protocolo de silenciamento gênico empregado não foi capaz de afetar a viabilidades celular, uma vez que não houve alteração nessas taxas no grupo controle do silenciamento (siCt), em relação ao grupo controle. O *knockdown* do versicam também não foi capaz de causar morte celular,

mantendo uma considerável viabilidade celular. Assim, a presença ou ausência das isoformas V0 e V1 de versicam não parece influenciar o processo de morte celular de células HTR-8/SVneo (Tabela 3).

	Ct	siCt	siVCAN
Apoptose Inicial (Anexina V <sup>+</sup> / PI <sup>-</sup> )	8 ±	13.7 ±	11.4 ±
	2.6%	1.5%	3%
Apoptose Tardia e Necrose (Anexina V <sup>+</sup> / PI <sup>+</sup> )	13.1 ±	7.9 ±	19.8 ±
	5.8%	5.5%	9.4%
Células Viáveis (Anexina PI <sup>-</sup> )	78.2 ±	78.1 ±	69 ±
	6.3%	4.2%	12.4%

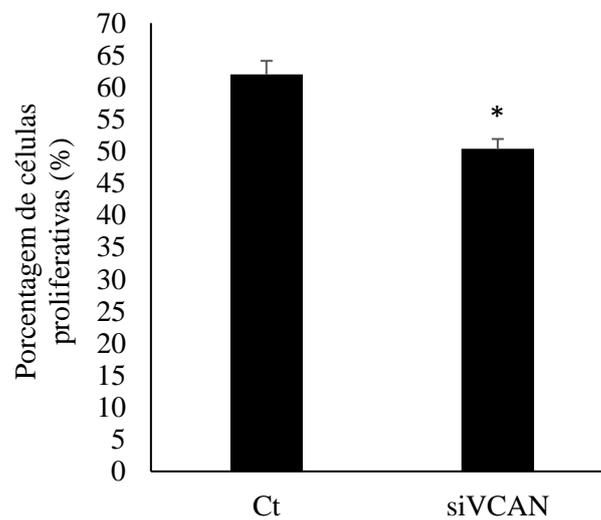
**Tabela 3. Avaliação de morte celular por marcação de Anexina V / Iodeto de Propídio em células HTR-8/SVneo.** Ct – Controle; siCt – Controle do Silenciamento; siVCAN – Silenciamento de versicam.  $p < 0,05$ .

### 5.3 Efeito do silenciamento gênico de versicam na proliferação e ciclo celular

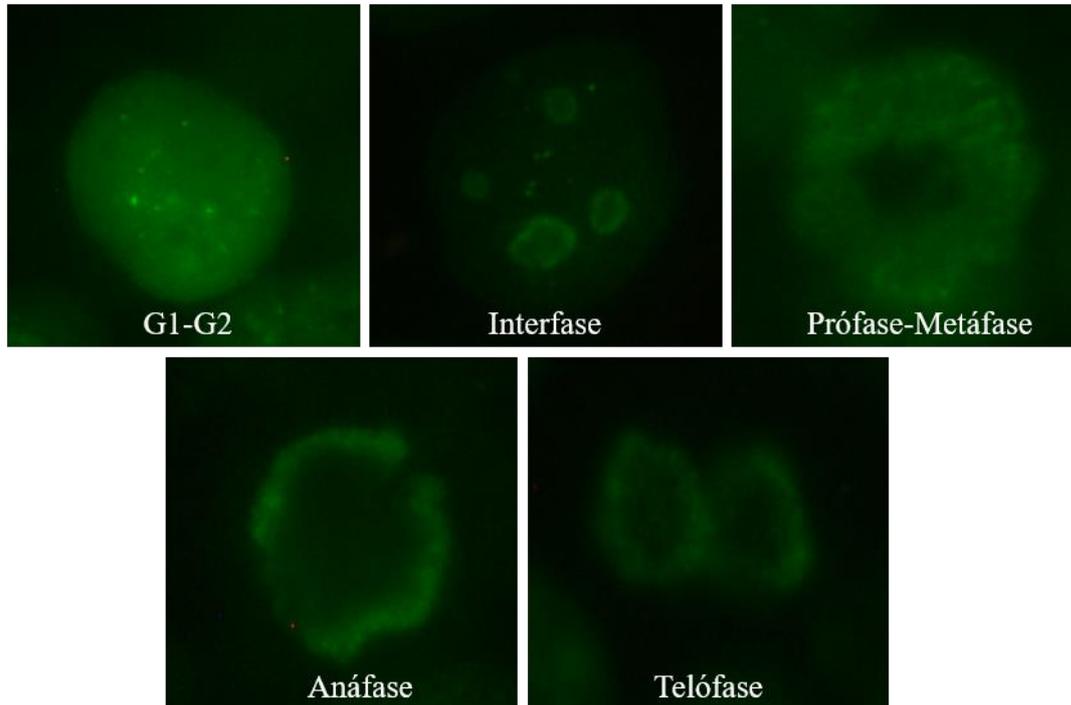
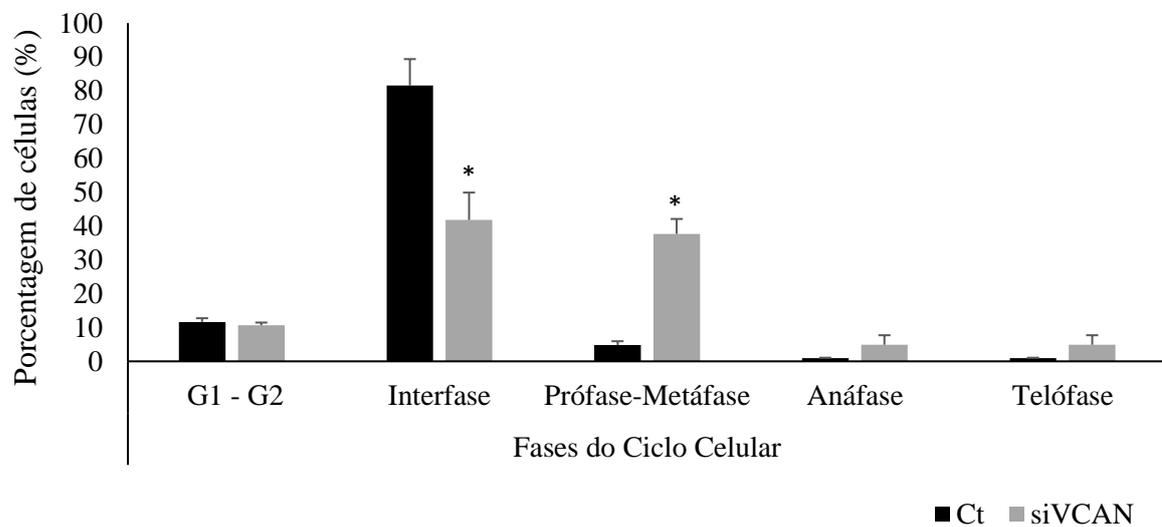
Como as taxas de viabilidade celular não foram alteradas pelo silenciamento gênico de VCAN por meio de siRNA, voltamos nossas análises a fim de analisar os efeitos do silenciamento de versicam sobre a proliferação celular na linhagem HTR-8/SVneo. Para tal finalidade, foi realizada a quantificação do ensaio de imunofluorescência para Ki-67, um marcador de proliferação. A análise foi realizada após 24h do silenciamento gênico, e através dela foi observado que em comparação com o grupo controle ( $62 \pm 2,1\%$ ), houve redução da taxa de proliferação do grupo exposto ao silenciamento gênico do versicam ( $50,4 \pm 1,5\%$ ;  $p = 0,033$ ) (Fig. 9).

Para avaliar se as fases do ciclo celular foram afetadas pelo silenciamento pós-transcricional de versicam, as células positivas para Ki-67 foram categorizadas nas diferentes fases do ciclo celular, seguindo a publicação de Raynov e colaboradores (2005). O processo de análise consistiu na verificação dos padrões de marcação para Ki-67 nas células. Durante as fases G1-G2, o Ki-67 está disposto de maneira densa do núcleo, bem como nas regiões teloméricas e centroméricas dos cromossomos. Progredindo para a fase S e a interfase, quando é possível registrar uma marcação intensa predominantemente nos nucléolos, bem como em pequenas áreas nucleoplásmicas dispersas. A condensação cromossômica durante a prófase e metáfase é registrada por meio de uma marcação nuclear positiva mais intensa nas

células. E durante a anáfase e a telófase, a intensidade da marcação para Ki-67 começa a diminuir e desaparecer em G0. A partir dessa análise, foi demonstrado que há diferenças nas porcentagens de células afetadas pelo silenciamento de versicam em cada uma das fases do ciclo celular, principalmente na intérfase (grupo controle apresentando  $81,56 \pm 7,8\%$ ; e grupo silenciado para versicam apresentando  $41,8 \pm 8,1\%$   $p = 0,028$ ) e prófase-metáfase (grupo controle apresentando  $4,85 \pm 1,1\%$ ; e grupo silenciado para versicam apresentando  $37,7 \pm 4,4\%$   $p = 0,015$ ). Estes dados sugerem que o silenciamento gênico para versicam conseguiu alterar as fases do ciclo celular nas células do grupo silenciado, quando comparadas com às células do grupo controle, sugerindo um atraso no ciclo celular das células silenciadas (Fig. 10).



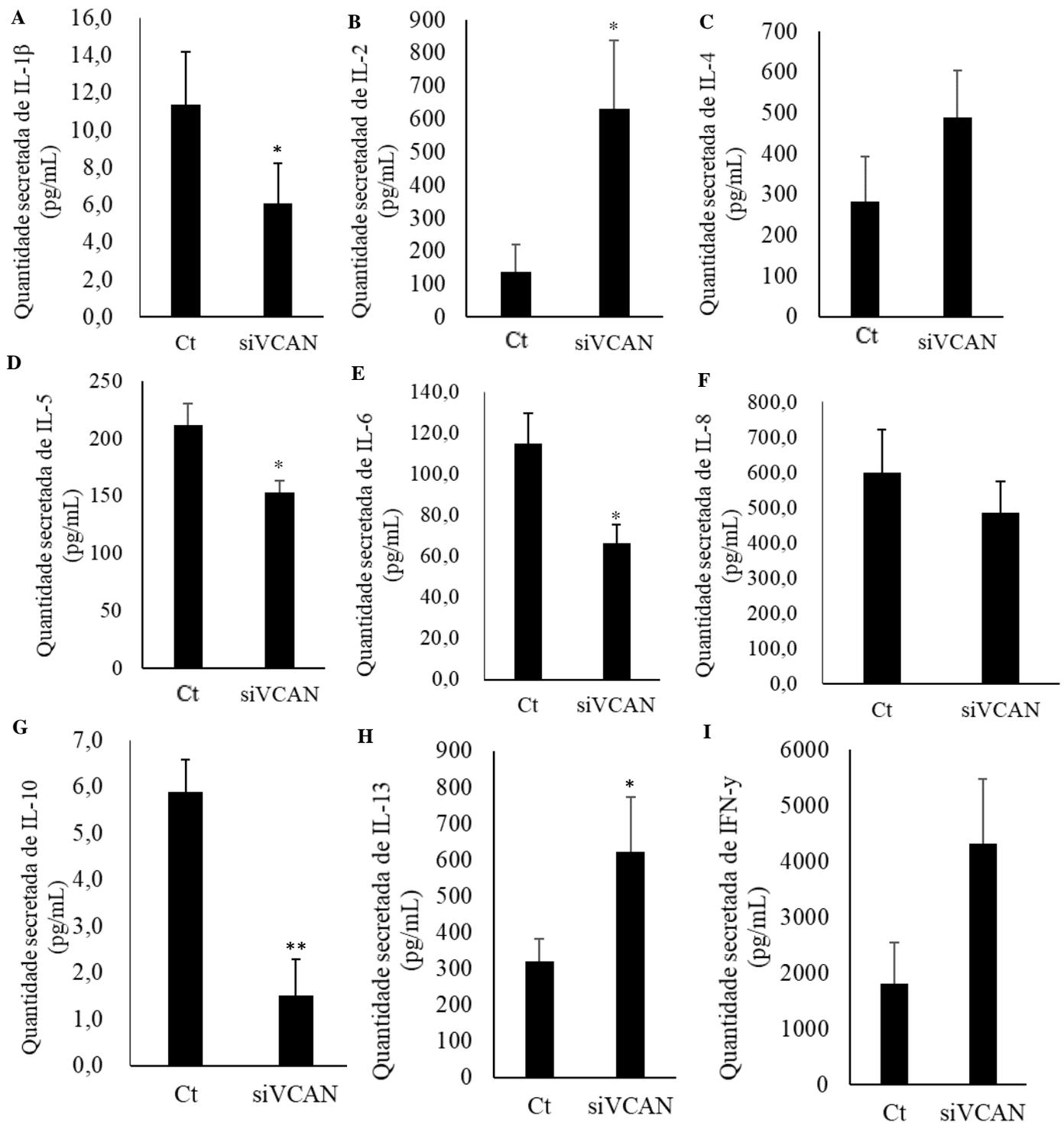
**Figura 9. Análise da proliferação celular por meio imunocoloração para Ki-67.** Porcentagem total de células em proliferação nos grupos controle (Ct) e no grupo com silenciamento para versicam (siVCAN). \*  $p < 0,05$ .

**A****B**

**Figura 10. Avaliação da porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular por meio de imunofluorescência para Ki-67.** A - Imagens representativas das fases do ciclo celular através da visualização por Ki-67 (ampliação 100x); B – Quantificação das fases do ciclo celular. Ct – Controle; siVCAN - Silenciamento de versican. \*  $p < 0,05$ .

#### 5.4 Efeitos do silenciamento gênico de versicam sobre a produção de citocinas

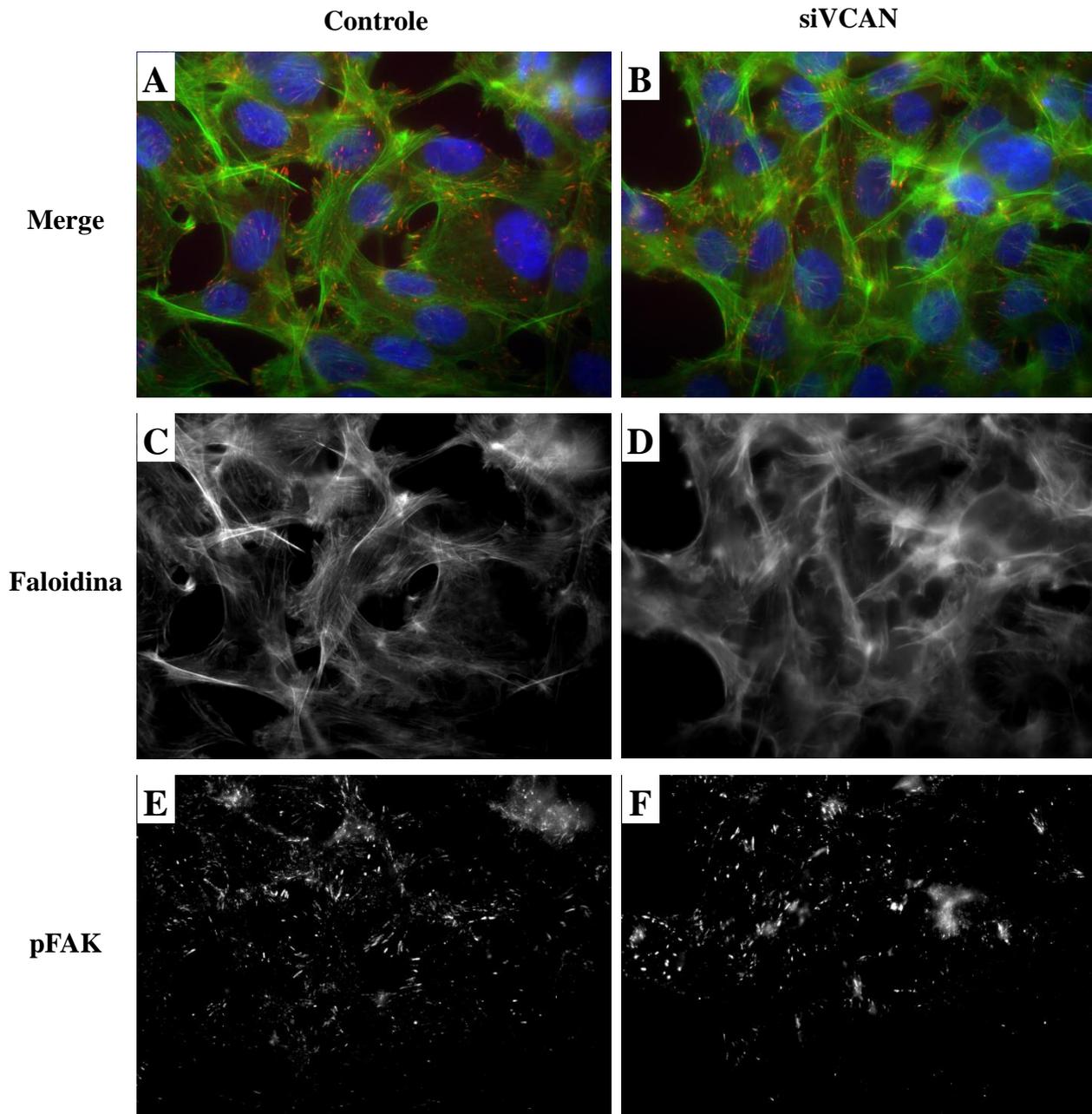
Visto que uma das importantes funções de células trofoblásticas é a produção de citocinas para regular o sistema imunológico materno, avaliamos a interferência do silenciamento gênico de versicam por intermédio de ensaio de citometria por *beads* e ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados demonstraram que a produção de diversas citocinas foi afetada, com uma redução na produção de IL-1 $\beta$  (de  $11,3 \pm 2,9$  pg/mL no grupo controle para  $6,1 \pm 2,1$  pg/mL no grupo silenciado;  $p < 0,05$ ), IL-5 (de  $150,18 \pm 42,3$  pg/mL no grupo controle para  $142,06 \pm 12$  pg/mL no grupo silenciado;  $p < 0,05$ ), IL-6 ( $114,9 \pm 14,5$  pg/mL no grupo controle, para  $66,2 \pm 9,2$  pg/mL no grupo silenciado;  $p = 0,04$ ) e IL-10 (de  $5,9 \pm 0,7$  pg/mL no grupo controle, para  $1,5 \pm 0,8$  pg/mL no grupo silenciado;  $p = 0,008$ ). Em contrapartida, houve um aumento na produção de IL-2 ( $392,35 \pm 262,2$  pg/mL no grupo controle, para  $556,26 \pm 177,4$  pg/mL no grupo silenciado;  $p < 0,05$ ) e IL-13 (de  $319,46 \pm 62,4$  pg/mL no grupo controle, para  $621,64 \pm 150,7$  pg/mL no grupo silenciado;  $p < 0,05$ ) nas células submetidas ao silenciamento gênico de versicam (siVCAN) em comparação com as células do grupo controle (Ct). TNF- $\alpha$  e IL12p70 não foram detectados em nenhum grupo (Fig. 11).



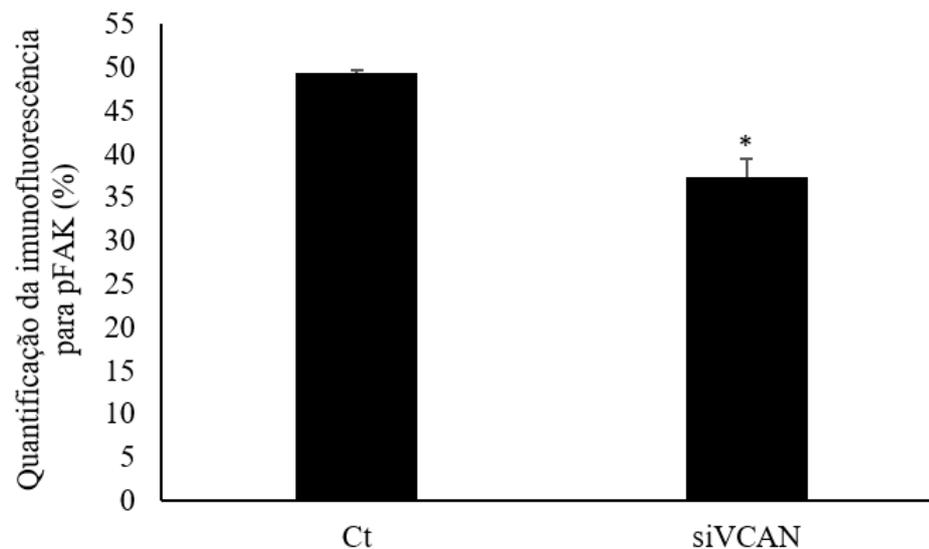
**Figura 11. Avaliação da secreção de citocinas em células HTR-8/SVneo.** Os grupos controle (Ct) e de células silenciadas para versicam (siVCAN) foram analisados para IL-1 $\beta$  (A), IL-2 (B), IL-4 (C), IL-5 (D), IL-6 (E), IL-8 (F), IL-10 (G), IL-13 (H) e IFN- $\gamma$  (I). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

### 5.5 Efeito do Silenciamento Gênico de Versicam na Expressão de pFAK

Como a adesão celular é uma importante característica no comportamento celular, e principalmente, dependente de interações com moléculas de MEC, foi realizada metodologia para verificar uma provável influência do silenciamento de versicam neste processo. Para tal finalidade, utilizamos imunomarcação para detectar a fosforilação da proteína de adesão focal (pFAK), a qual apenas está fosforilada nas regiões celulares que estabelecem adesões focais, e é uma molécula fundamental envolvida no controle da interação entre células e a MEC circunvizinha. Assim, é possível observar uma redução da proteína FAK fosforilada nas células silenciadas para versicam (siVCAN) em comparação com as células do grupo controle (Ct) qualitativa (Fig. 12) e quantitativamente, representando uma diminuição de cerca de  $49,2 \pm 0,31\%$  da intensidade de fluorescência de pFAK quantificada no grupo controle, para aproximadamente  $37,26 \pm 2,11\%$  no grupo silenciado ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 13).



**Figura 12. Marcação para faloidina e imunomarcação para pFAK.** Grupo controle (A, C e E) e no grupo siVCAN (B, D e F) (ampliação 100x); Verde - Faloidina; Vermelho – pFAK; Azul - DAPI.



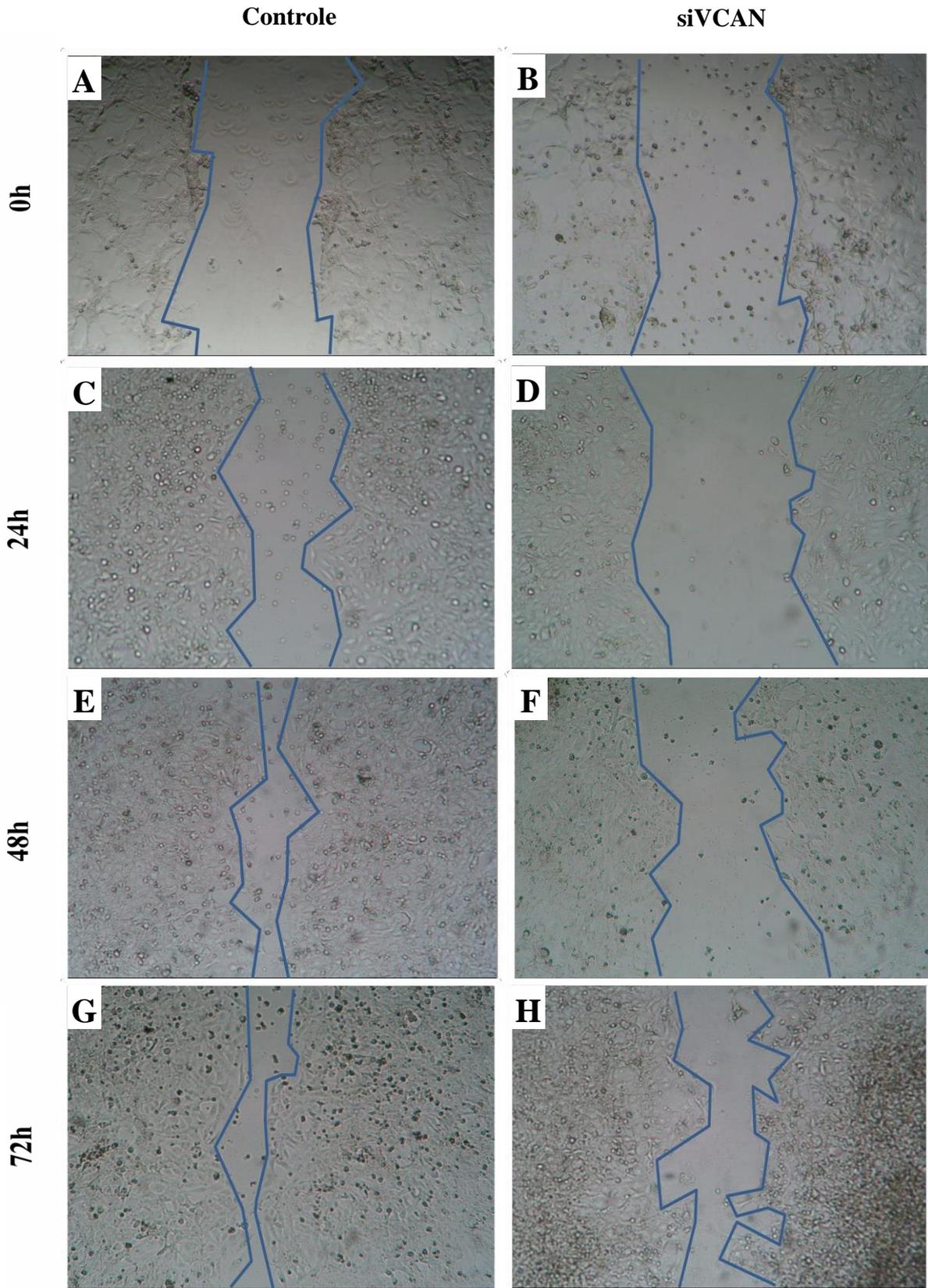
**Figura 13. Quantificação da imunofluorescência para pFAK.** Ct – Controle; siVCAN – células silenciadas para versicam. \* $p < 0,0001$ .

#### 5.6 Efeito do silenciamento gênico de versicam na migração celular

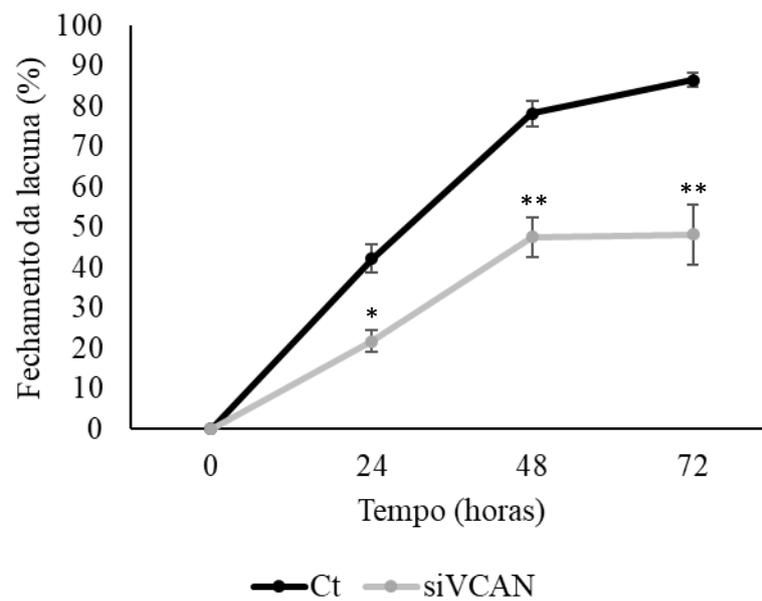
Visto que a ausência de versicam reduz a quantidade de FAK fosforilada, avaliamos o efeito do silenciamento gênico na migração das células. Para tal, foi realizado ensaio de ferida *in vitro*, onde o tempo de fechamento da lacuna realizada na monocamada pode ser comparado no grupo controle e no grupo silenciado. A análise foi realizada nos períodos de 0, 24, 48 e 72h após o procedimento de silenciamento gênico. Foi observado que em comparação ao grupo controle (Fig. 14 A-G), o grupo silenciado (Fig. 14 B-H) aumentou em aproximadamente o dobro do tempo de fechamento da lacuna *in vitro*, o que foi comprovado também pela quantificação do ensaio; no tempo de 24 horas, houve redução de  $42,22 \pm 3,5\%$  da área de fechamento da lacuna no grupo controle, para  $21,82 \pm 2,62$  no grupo silenciado ( $p < 0,05$ ); no tempo de 48 horas, a redução de  $78,28 \pm 3,13\%$  no grupo controle para  $47,59 \pm 5,01\%$  no grupo silenciado ( $p < 0,001$ ); e no tempo de 72 horas, a redução na porcentagem do fechamento da lacuna foi de  $86,52 \pm 1,68\%$  no grupo controle, para  $48,20 \pm 7,32\%$  no grupo silenciado ( $p < 0,001$ ) (Fig. 15), mostrando que o silenciamento gênico do versicam exerceu um efeito inibitório sobre a migração das células HTR-8/SVneo.

Para confirmar que a migração foi afetada pelo silenciamento gênico, foi avaliada a velocidade celular através da técnica de videomicroscopia *time lapse*. Com essa técnica, observamos que a velocidade das células silenciadas também foi reduzida quando comparada ao controle. O grupo controle apresentou uma velocidade de  $0,31 \pm 0,52$  mm/min, a velocidade de migração no grupo controle do silenciamento foi de  $0,30 \pm 0,32$  mm/min e o

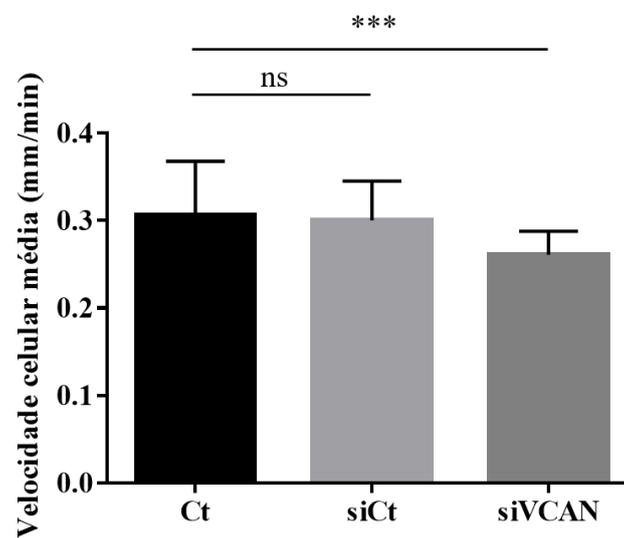
grupo silenciado apresentou velocidade de  $0,26 \pm 0,21$  mm/min (valores de  $p$ : Ct x siCt,  $p > 0,05$ ; Ct x siVCAN,  $p < 0,0001$ ) (Figura 16).



**Figura 14.** Ensaio “scratch” com células HTR-8/SVneo. A, C, E e G - Grupo controle após 0, 24, 48 e 72h (ampliação x4); B, D, F e H - Grupo com silenciamento de versicam após 0, 24, 48 e 72h (ampliação x4).



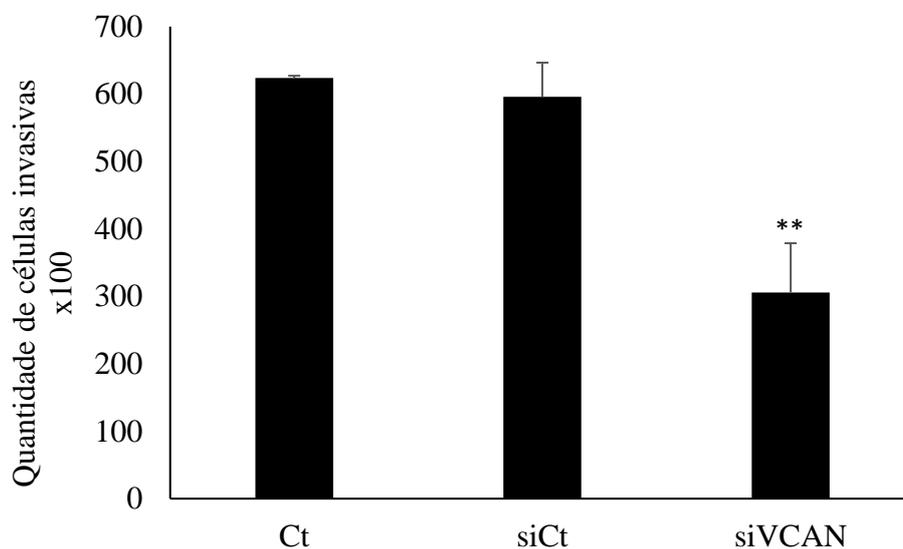
**Figura 15.** Quantificação do ensaio de migração celular, por meio da análise “scratch”. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ .



**Figura 16.** Velocidade migratória analisada por videomicroscopia *time-lapse*. Velocidade calculada em 17 horas, após 24 horas de silenciamento para VCAN. Ct, Controle; siCT, controle do silenciamento; siVCAN, silenciamento gênico de versicam. \*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 5.7 Efeito do silenciamento gênico de versicam na invasão celular

Mediante os resultados acerca da habilidade migratória e a velocidade das células submetidas ao silenciamento de versicam, demonstrando que ambos os fenômenos são afetados pela ausência dessa molécula, tendo reduzido-os de maneira significativa; as análises foram direcionadas para outro evento celular de semelhante importância, a invasão celular. Os ensaios de invasão em fibronectina em câmaras tipo *transwell* foram utilizados para análise do efeito do silenciamento do versicam na invasão celular. Nossos resultados mostraram que após o silenciamento houve uma redução estatisticamente significativa da invasão das células HTR-8/SVneo na matriz de fibronectina quando comparada com o grupo controle (Fig. 17), reafirmando, desse modo, que o versicam participa ativamente da mobilidade celular.

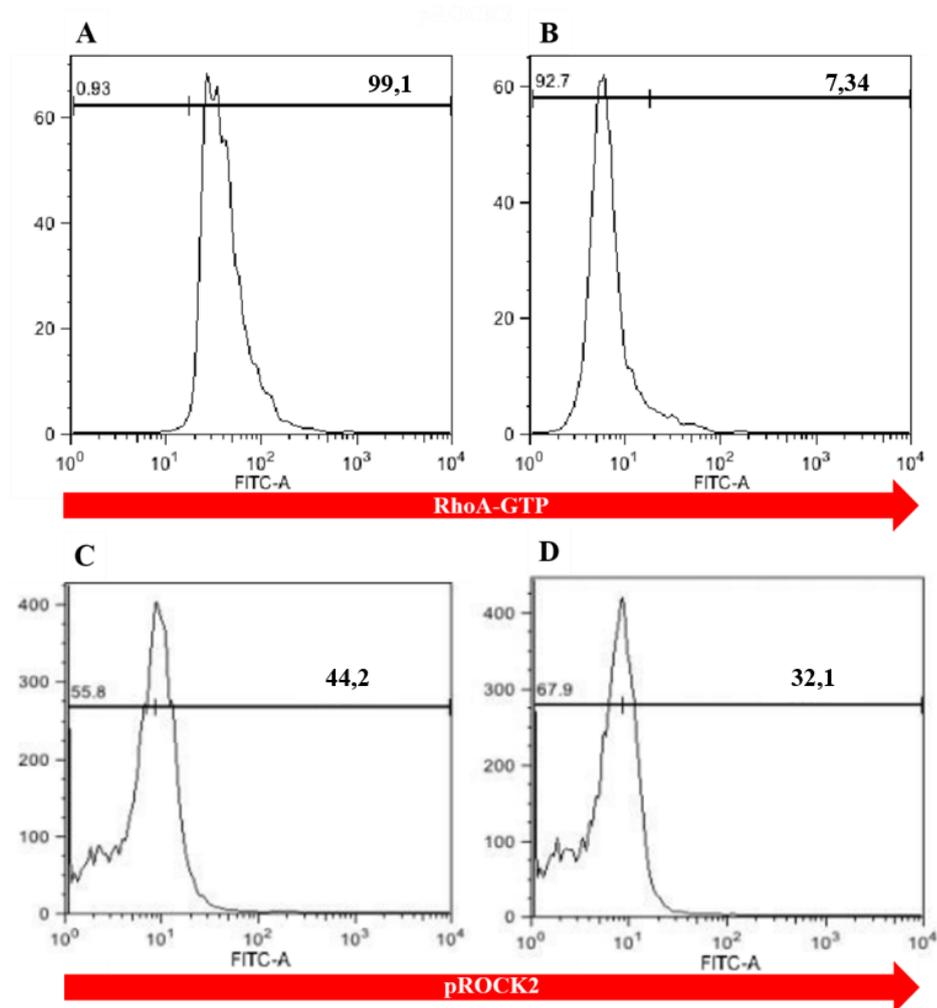


**Figura 17. Ensaio de invasão em fibronectina em câmaras bipartites tipo *Transwell* em células HTR-8/SVneo.** Ct – Controle; siCt – Controle do Silenciamento; siVCAN – Silenciamento de versicam. \*\*  $p < 0.001$ .

### 5.8 Efeito do silenciamento gênico de versicam na sinalização RhoA/ROCK2

Por meio citometria de fluxo, foi avaliada a influência do silenciamento gênico de versicam na sinalização RhoA/ROCK2. A análise dessas vias mostrou uma expressiva diminuição dos níveis relativos de RhoA fosforilada, de 99,1% no grupo controle, para 7,34% após o silenciamento gênico para versicam (Fig. 18 A-B). A análise de ROCK2 também demonstrou que os níveis relativos de ROCK2 fosforilada foram afetados pelo silenciamento gênico de versicam; de 44,2% no grupo controle, para 32,1% no grupo de células submetidas ao silenciamento gênico de versicam (Fig. 18 C-D). Com os resultados obtidos foi possível detectar que RhoA-GTP e pROCK2 reduziram sua atividade em células HTR-8/SVneo

silenciadas para versicam, confirmando o seu envolvimento na sinalização desse proteoglicano.



**Figura 18. Avaliação das vias RhoA-GTP/ROCK2 em células HTR-8/SVneo.** Citometria de fluxo para RhoA-GTP nos grupos controle (A) e silenciado para versicam (B); Citometria de fluxo para pROCK2 nos grupos controle (C) e silenciado para versicam (D).

## 6 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi realizada a técnica de silenciamento gênico pós-transcricional para o proteoglicano versicam em células da linhagem HTR-8/SVneo com a finalidade de analisar as funções celulares que poderiam ser afetadas na ausência dessa molécula. O silenciamento de versicam foi eficiente, os níveis de mRNA e proteína versicam foram significativamente reduzidos. A proliferação foi levemente diminuída e o tempo de fechamento da lacuna *in vitro* foi muito reduzido. A velocidade das células foi analisada por meio de videomicroscopia *time-lapse* e corroborou com os dados de fechamento da lacuna realizada *in vitro*, visto que houve uma leve redução da velocidade celular; os ensaios de invasão celular em câmaras tipo *transwell* demonstraram que a ausência do versicam em células HTR-8/SVneo foi capaz de reduzir consideravelmente a capacidade invasiva dessa linhagem celular em um substrato de fibronectina. Várias citocinas também foram afetadas, com produção reduzida de IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6 e IL-10, enquanto aumentaram a produção de IL-2 e IL-13. A análise de pFAK mostrou diminuição da fosforilação após o silenciamento. Deste modo, nossos resultados mostraram que a ausência de versicam reduziu significativamente a migração e invasão celular, sem provocar aumento significativo de morte nas células, tornando assim, o versicam uma importante molécula alvo para futuras terapias visando modificação da motilidade celular.

Anteriormente, a expressão de outros proteoglicanos, decorim e biglicam, em diferentes doenças gestacionais já foi demonstrada, sugerindo a existência de mecanismos gerais nos quais os proteoglicanos poderiam participar da regulação geral da migração e invasão de células trofoblásticas (BORBELY et al., 2014). Em outro estudo de nosso grupo, foi demonstrado que as isoformas V0 e V1 de versicam são produzidas apenas por células trofoblásticas invasivas de primeiro trimestre de gestação e de AIP, ainda mostrando que o versicam pode ser usado como marcador específico para essa doença quando comparada sua expressão com outras doenças gestacionais (SANTOS e GONÇALVES et al., submetido). As mesmas isoformas V0 e V1 também foram relatadas apresentando função importante na diferenciação do citotrofoblasto viloso em sinciotrofoblasto, sendo que o silenciamento gênico aumentou a morte celular e reduziu a fusão sincicial e a produção de hCG (PIRES e GONÇALVES et al., 2018). Interessantemente, as mesmas isoformas V0 e V1 já foram amplamente descritas por seu papel indutor de migração, invasão e metástase de células neoplásicas (WIGHT, 2002; WEEN et al., 2011a, b; MITSUI et al., 2017; DE WIT et al., 2017).

Para a realização do presente trabalho, optamos por utilizar a linhagem de células HTR-8/SVneo, a qual é proveniente do EVT do primeiro trimestre de gestação. Desta forma, sendo HTR-8/SVneo uma linhagem com um perfil altamente invasivo e que é comumente usada para estudar invasão, migração e regulação fisiológica do EVT de primeiro trimestre (CHAKRABORTY et al., 2002; ZOU et al., 2015; YANG et al., 2016), a utilizamos como um modelo para o silenciamento gênico de versicam. O silenciamento gênico tem sido adotado como uma ferramenta para inativar a expressão gênica de determinadas moléculas, configurando assim, um método de interferência pós-transcricional capaz de produzir fenótipos que podem ser observados por longos períodos de tempo (HANNON, 2002; MEISTER e TUSCHL, 2004), sendo extremamente útil na observação do comportamento das células na ausência da molécula alvo; assim como tem sido uma técnica amplamente utilizada em terapias gênicas, principalmente antineoplásicas (YANG et al., 2018; ZHAO et al., 2017; BUDURU et al., 2018; HERNÁNDEZ et al., 2011).

A eficácia do experimento de silenciamento gênico no presente estudo foi demonstrada por três técnicas distintas, tanto a nível de produção de mRNA, sendo mostrada a supressão do mRNA das isoformas V0 e V1 de VCAN (principalmente a isoforma V1, que foi completamente ausente no grupo submetido ao silenciamento de VCAN); quanto a nível protéico, apresentando redução drástica da expressão do versicam após o silenciamento. Outros trabalhos já realizaram o silenciamento gênico para versicam, a maioria destes, direcionados para esclarecer o papel desta molécula em processos celulares como a migração, proliferação, invasão e adesão, principalmente em células tumorais, validando o versicam como uma molécula essencial na proliferação, invasão, migração e adesão de células neoplásicas (HERNÁNDEZ et al., 2010; CARTHY et al., 2015; DESJARDINS et al., 2014; WANG et al., 2015).

No presente trabalho, o silenciamento gênico de versicam não alterou as taxas de morte das células HTR-8/SVneo, em comparação com o grupo controle, mantendo uma considerável estabilidade na viabilidade celular (em torno de 80%), demonstrando que provavelmente o versicam não seja essencial para a sobrevivência dessas células. No entanto, estudos prévios realizados pelo nosso grupo, demonstraram que o silenciamento gênico de versicam na linhagem celular BeWo (proveniente de coriocarcinoma) aumentou a morte das células, mas apenas das que apresentavam características de sincicialização (PIRES e GONÇALVES et al., 2018). Assim, podemos concluir que células HTR-8/SVneo e BeWO possuem diferentes vias de sinalização para sua sobrevivência, como também já foi demonstrado em estudos anteriores (HAIDER et al., 2016; GROTEN et al., 2010). LaPierre e colaboradores (2007),

corroboraram o que foi encontrado na linhagem BeWo, mostrando que o versicam aumentou a sobrevivência celular e a resistência de fibroblastos à apoptose. Outros trabalhos revelaram que determinados domínios moleculares do versicam protegem as células da apoptose induzida por intermédio da ligação a receptores de morte (CATTARUZZA et al., 2004; DU et al., 2013). No entanto, Zhao e colaboradores (2017) corroboram nossos resultados com a linhagem HTR-8SV/neo, visto que o silenciamento gênico de versicam em células de carcinoma de tireoide humano não apresentou diferenças na viabilidade celular entre os grupos controle e silenciado. Deste modo, o versicam pode agir para aumentar a viabilidade celular e reduzir apoptose ou pode não influenciar essas funções, dependendo do tipo celular estudado, podendo ter uma via específica de ação.

Com relação a proliferação celular, nossos resultados demonstraram que a supressão de versicam resultou apenas em uma leve redução na proliferação celular e atraso no ciclo celular após o silenciamento gênico. Em outros estudos que realizaram o silenciamento de versicam, Bukong e colaboradores (2016) utilizando um modelo experimental de fibrose hepática, demonstram que o *knockdown* desse proteoglicano reduziu a proliferação celular. O mesmo foi encontrado por Zhao e colaboradores (2017) em células de carcinoma de tireóide humano e por Creighton e colaboradores (2005), com células de câncer de pulmão. Poucos trabalhos já associaram o silenciamento gênico para versicam e as fases do ciclo celular. Carthy e colaboradores (2015) demonstraram a presença do versicam no núcleo de células musculares lisas da aorta de ratos em proliferação, indicando que esta molécula está envolvida no processo mitótico dessas células. Ainda, o bloqueio da expressão de versicam interrompeu a organização do fuso mitótico e levou à formação de fusos multipolares durante a metáfase, o que pode ajudar a entender nossos resultados. Em um contexto gestacional, como as células trofoblásticas tem um poder de proliferação bastante acentuado, a linhagem HTR-8/SVneo se apresentou como um bom modelo para representar esse potencial proliferativo. Visto que esta linhagem representa células do citotrofoblasto de primeiro trimestre de gestação com alto potencial de proliferação, o qual extravasa os limites da vilosidade coriônica, diferenciando-se em células EVT, que também possuem um fenótipo proliferativo e invasivo (BOYD, HAMILTON, 1970) e participando dos processos de invasão da decídua basal e a remodelação das artérias espiraladas uterinas (KAUFMANN, CASTELUCCI, 1997; KEMP et al., 2002; LOREGGER et al., 2003). O bloqueio da expressão de versicam nessas células e afetando também algumas fases do ciclo celular, retardando-o, pode demonstrar a importância desse proteoglicano nas fases iniciais da gestação, quando há a necessidade de

um potencial proliferativo maior das células trofoblásticas para que ocorra uma implantação embrionária bem-sucedida.

Uma gravidez bem-sucedida requer comunicações cuidadosamente coordenadas entre a mãe e o feto. Células imunológicas e vias de sinalização de citocinas participam como mediadores dessas comunicações para promover uma gravidez saudável, principalmente no início da gestação, quando é necessário uma maior tolerância do corpo da mãe. Ao mesmo tempo, certas infecções ou condições inflamatórias em mães grávidas causam doenças graves e têm impactos prejudiciais sobre o feto em desenvolvimento (YOCKEY e IWASAKI, 2018). Por exemplo, quando o blastocisto se liga e invade o endométrio, este processo é acompanhado por uma resposta inflamatória evolutivamente conservada incluindo IL-6, IL-1 e LIF, na qual os tipos celulares envolvidos são as células dendríticas e células uNK (APLIN e RUANE, 2017). Durante o desenvolvimento da placenta no primeiro trimestre, as células imunológicas, incluindo células uNK e mastócitos, são necessárias para a remodelação da artéria espiral uterina, como demonstrado por modelos em ratos, onde a presença de IFN- $\gamma$  também é necessária para o processo de remodelação e adaptação desses vasos para a gestação (ASHKAR et al., 2000).

Poucos estudos associaram o silenciamento gênico de versicam com a produção de citocinas. No presente trabalho, foi demonstrado que o silenciamento gênico de versicam em células HTR-8/SVneo afetou a produção de algumas citocinas; como a redução de IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6 e IL-10; e aumento da produção de IL-2 e IL-13. Wang e colaboradores (2015) mostraram que, o silenciamento deste proteoglicano em células de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) reduz o acúmulo de citocinas inflamatórias associadas ao tumor, como CSF, TNF- $\alpha$ , IL-6, VEGF e IL-10 *in vivo*. O versicam é conhecido por favorecer a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6, promovendo fortemente a progressão tumoral (KIM et al., 2009). Ademais, células inflamatórias e neoplásicas são capazes de aumentar a expressão de versicam, o que provoca uma cascata de secreção de citocinas inflamatórias a gerar um microambiente inflamatório que fornece a progressão tumoral e metástases (GAO et al., 2012). Por conseguinte, podemos presumir que em nosso modelo, o versicam contribui com o perfil pró-inflamatório local, o que pode contribuir para o crescimento da placenta e invasão fisiológica ou exacerbada, no caso da AIP.

Para corroborar essa hipótese, avaliamos as conhecidas atividades anti-adesivas e pró-migratórias do versicam (MUKARATIRWA et al., 2004; LABROPOULOU et al., 2006; KUSUMOTO et al., 2010). Embora as células trofoblásticas, e principalmente o EVT, possuam uma forte capacidade de invasão, raramente esse tipo celular exhibe capacidade de

proliferação fora da etapa de implantação e estabelecimento da placenta no primeiro trimestre de gestação. Isso indica que a adesão e invasão das células trofoblásticas mantém o equilíbrio dinâmico na interface materno-fetal durante a gestação (WANG et al., 2017). No presente trabalho, a supressão de versicam resultou em uma diminuição da expressão de pFAK, sugerindo uma menor quantidade de adesões focais, indiretamente indicando reduzida capacidade de adesão das células silenciadas. Bu e Yang (2014) demonstraram que em células de melanoma maligno, uma superexpressão de versicam promoveu o aumento da migração celular, enquanto o silenciamento gênico de versicam reduziu significativamente a migração dessas células. Da mesma forma, Desjardins e colaboradores (2014) demonstraram que o silenciamento gênico de versicam foi capaz de reduzir a capacidade de adesão de células de carcinoma epitelial de ovário; assim como estudos demonstraram que células derivadas de Linfoma T-Anaplásico de Células Grandes (ALCL), da linhagem Karpas 299, apresentaram uma diminuição da adesão quando submetidas ao *knockdown* da expressão de versicam (HAVRE et al., 2013).

Com relação à migração, já foi observado que a redução da expressão de versicam em células de músculo liso (HUANG et al., 2006) ou em células de câncer de próstata (RICCIARDELLI et al., 2007), reduziu a migração celular nos ensaios de ferida. Hernández e colaboradores (2010) mostraram em seus estudos que o *knockdown* das isoformas V0 e V1 de versicam em células de melanoma humano foi capaz de provocar uma diminuição da capacidade migratória dessas células por intermédio de colágeno I e ácido hialurônico. Desta forma, podemos observar que os efeitos observados por outros estudos corroboram nossos resultados, confirmando o papel importante do versicam na regulação da migração celular e indicando assim um papel de protagonista durante a invasão trofoblástica na placentação. Existem evidências de que isoformas específicas de versicam podem afetar a atividade das células tumorais. Justamente as isoformas V0 e V1 são as isoformas predominantes presentes em tecidos neoplásicos (RICCIARDELLI et al., 2009). Onken e colaboradores (2014) mostraram que a regulação de versicam por um siRNA específico para diminuir a expressão da isoforma V1 reduziu significativamente a migração em células de glioma humano. Alguns estudos consideram que a influência do versicam sobre a migração, seja provavelmente facilitada pelo domínio G1 da molécula (TOUAB et al., 2002; SAKKO et al., 2003), que por conter cadeias GAG, podem criar uma matriz extracelular mais hidratada, menos favorável para adesão (HERNÁNDEZ et al., 2011). No entanto, existem estudos que utilizaram condroitinase ou apenas o cerne proteico de versicam, e ainda assim observaram ação

importante desse proteoglicano na migração e invasão das células (EVANKO et al., 2011; KEIRE et al., 2014).

O uso de mitomicina C para os experimentos de migração *in vitro* (mais especificamente o ensaio de ferida *in vitro*) foi descartado dos experimentos pelo fato de que a linhagem HTR-8/SVneo apresentou alta sensibilidade ao estímulo do siRNA juntamente com a substância inibidora de proliferação, resultando em alto índice de morte celular (dados não mostrados). A concentração escolhida para nossos experimentos foi de 10 µg/mL, baseado com estudos anteriores de Nadeem e colaboradores (2011), Luo e colaboradores (2012) e Ding e colaboradores (2015), no entanto, foi possível observar mudanças nas células a partir de 24 horas da realização da transfecção e do tratamento com mitomicina C, não sendo possível prolongar o experimento até 48 e 72 horas devido a esse percalço. Estudos anteriores já demonstraram que o tratamento com mitomicina C é capaz de causar apoptose em células estromais endometriais humanas (FLUHR et al., 2007); outros trabalhos demonstraram que o uso de siRNA para o *knockdown* protéico em linhagem celular humana de câncer de bexiga urinária, M-RT4, foi capaz sensibilizar significativamente essa linhagem celular para mitomicina C (WANG et al., 2019). Outra trabalho demonstrou o potencial do uso de siRNA para o aumento da sensibilidade a mitomicina C; Wang e colaboradores (2006) demonstraram também o aumento de apoptose induzida por mitomicina C em células da linhagem humana T24 de câncer de bexiga urinária, transfectadas com siRNA. Já Cui e colaboradores (2015) demonstraram que, em xenoinxertos de tumores de células de bexiga humana RT4, *in vivo* e *in vitro*, o potencial de ação apoptótica da mitomicina C foi aumentado quando feita o uso de siRNA na terapia. O uso de terapias baseadas em RNA de interferência também se mostrou eficiente em células de câncer de cólon humano, RKO, nas quais foi verificado a melhoria da eficácia de apoptose induzida por mitomicina C (KOEDRITH e YOUNG, 2011).

Adicionalmente, análises realizadas no presente trabalho demonstraram que o bloqueio da produção de versicam em células da linhagem HTR-8/SVneo foi capaz de promover uma redução significativa na invasão dessas células em uma matriz de fibronectina quando comparada com o grupo controle, reafirmando, desse modo, que o versicam participa ativamente da mobilidade celular. Outrossim, uma variedade de pesquisas tem apontado o versicam como molécula anti-adesiva, pró-migratória e pró-invasiva, e principalmente em estudos com câncer, ele vem sendo associado à metástases, aumento de invasividade e progressão tumoral (MUKARATIRWA et al., 2004; LABROPOULOU et al., 2006; KUSUMOTO et al., 2010). Em células de melanoma maligno, uma maior expressão de versicam promoveu a migração celular e a inibição da expressão dessa molécula, mediada

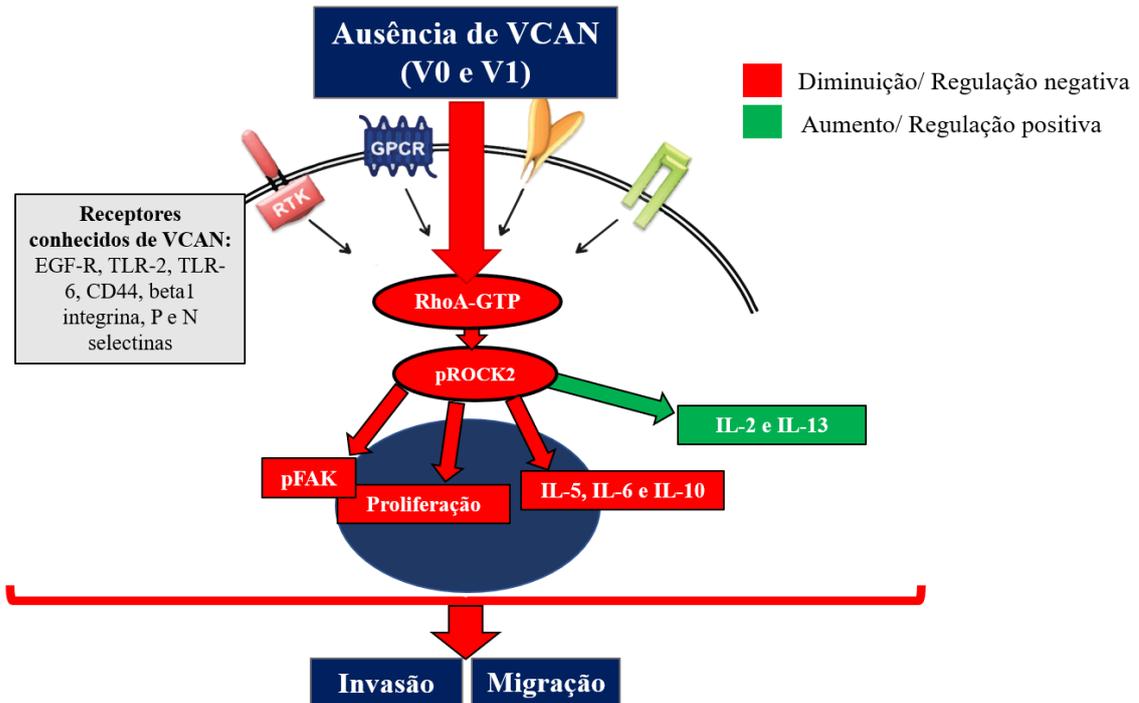
pelo silenciamento gênico, suprimiu significativamente padrões de motilidade celular, como a migração (BU e YANG, 2014) e revelou maior adesão ao colágeno, laminina e fibronectina, o que foi identificado por meio de ensaios de cicatrização de ferida e em câmaras bipartites verticais, tipo *Transwell* (HERNÁNDEZ et al., 2011).

Da mesma forma, foi observado em células de músculo liso uma diminuição da migração celular nos ensaios de ferida (HUANG et al., 2006), ou em células de câncer de próstata, em que a adição de versicam às células causou um aumento na capacidade de invasão (RICCIARDELLI et al., 2007). Os resultados do presente estudo corroboram os dados apresentados na literatura, ao mostrar que o silenciamento do versicam apresentou efeito semelhante nas células HTR-8/SVneo, reduzindo tanto a migração, quanto a invasão celular substancialmente e demonstrando assim, a potencial influência dessa molécula no processo de invasão celular trofoblástica (KNÖFLER et al., 2008). Considerando o perfil desse proteoglicano e a AIP como uma doença onde há uma invasão exacerbada das células trofoblásticas (BENIRSCHKE et al., 2012), é provável que o versicam esteja envolvido na invasividade exagerada desta doença.

No presente trabalho, a redução da expressão de versicam foi capaz de reduzir a atividade de RhoA-GTP e pROCK2 em células HTR-8/SVneo submetidas ao silenciamento gênico de versicam, sugerindo um provável envolvimento dessa via na sinalização de versicam nessa linhagem celular. Rho GTPases são conhecidas por seu envolvimento no rearranjo da arquitetura celular durante a migração, motilidade, morfologia, polaridade, divisão celular e expressão gênica (HODGE e RIDLEY, 2016); estudos de Hall e Ridley (1992) demonstraram o envolvimento da Rho GTPase Rac na formação de lamelipódios, enquanto RhoA é capaz de estimular a formação de fibras de actomiosina. A via de sinalização Rho-GTP/ROCK, também é conhecida como uma via essencial em eventos celulares como proliferação, migração, fagocitose, polimerização de microtúbulos, adesão e organização de citoesqueleto (HARTMAN et al., 2015). Estudos anteriores demonstraram que Rho e ROCK também podem desempenhar papéis essenciais no desenvolvimento pré-implantacional em humanos (XIE et al. 2010; YAN et al. 2013; HUANG et al. 2016).

Por fim, os resultados apresentados no presente trabalho mostram que o versicam age diretamente no processo de motilidade celular, além de interferir na produção de citocinas conhecidas por possuírem um papel pró-invasivo (Fig. 19); e por isso poderia ser considerado um promissor alvo terapêutico para a AIP. Sendo as ações de inibição, silenciamento ou bloqueio desta molécula feitas assim que diagnosticada a doença, possam ser úteis para estabilizar o processo de invasão exagerada e prevenir o agravamento da doença, não

chegando aos pontos críticos de maior morbidade tanto para a mãe quanto para o feto, inclusive prevenindo a histerectomia quando possível. No entanto, mais estudos são necessários a respeito da via de regulação específica do versicam sobre a invasão e migração das células trofoblásticas, e sobre a melhor forma de utilizá-lo em um tratamento inovador.



**Figura 19.** Esquema representativo de proposta de sinalização para silenciamento gênico de versicam em HTR-8/Svneo. Fonte: Adaptado de Hartmann e colaboradores (2015).

## 7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados neste trabalho, é possível concluir que:

1. A padronização do protocolo de silenciamento gênico para o versicam em células trofoblásticas da linhagem HTR-8/SVneo foi realizado com sucesso;
2. O silenciamento do versicam parece não afetar significativamente os processos de morte e proliferação celular;
3. O silenciamento gênico de versicam é capaz de reduzir os níveis de moléculas consideradas pró-invasivas, tais como IL-5 e IL-6.
4. O *knockdown* da expressão de versicam foi capaz de reduzir a adesão de células trofoblásticas da linhagem HTR-8/SVneo;
5. A considerável redução da migração, velocidade e invasão celular após o silenciamento gênico para o versicam evidencia o papel desse proteoglicano como um regulador chave na motilidade das células HTR-8/SVneo, podendo este ser um promissor alvo terapêutico para AIP.

## REFERÊNCIAS

AFRATIS, N., *et al.* Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. *The FEBS Journal*. 279, 1177–1197, 2012.

ALARCON, V.B., MARIKAWA, Y. ROCK and RHO Playlist for Preimplantation Development: Streaming to HIPPO Pathway and Apicobasal Polarity in the First Cell Differentiation. In: Knott J., Latham K. (eds) Chromatin Regulation of Early Embryonic Lineage Specification. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, vol 229. Springer, Cham., 2018.

APLIN, J.D., AND RUANE, P.T. Embryo-epithelium interactions during implantation at a glance. *Journal of Cell Science*, 130, 15–22, 2017.

ARSLAN, F. *et al.* The role of versican isoforms V0/V1 in glioma migration mediated by transforming growth factor- $\beta$ 2. *British journal of cancer*, v. 96, n. 10, p. 1560, 2007.

ASHKAR, A.A., DI SANTO, J.P., AND CROY, B.A. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *The Journal of Experimental Medicine*, 192, 259–270, 2000.

AVRAM, S. *et al.* Chondroitin Sulfate Proteoglycans: Structure-Function Relationship with Implication in Neural Development and Brain Disorders. *BioMed Research International*. 2014:642798. doi:10.1155/2014/642798, 2014.

BALL, E. *et al.* Late sporadic miscarriage is associated with abnormalities in spiral artery transformation and trophoblast invasion. *The Journal of Pathology*, 208:535–42, 2006.

BENIRSCHKE, K.; KAUFMANN, P., BAERGEN, R.N. *Pathology of the human placenta*. New York: Springer-Verlag; 2006. 1050 p.

BINDER, M. J. *et al.*, The extracellular matrix in cancer progression: Role of hyaluronan proteoglycans and ADAMTS enzymes. *Cancer Letters*. v. 385, p. 55-64, 2016.

BISCHOF, P., MEISSER, A., CAMPANA, A. Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion —a review. *Placenta*. 21(Suppl A):S55–S60, 2000.

BODE-LESNIEWSKA, B. et al. Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult human tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. v. 44, p. 303–312, 1996.

BORBELY, A.U. A influência do biglicam mediada por receptores do tipo Toll-like 2 e 4 no processo de invasão das células trofoblásticas. *Tese de Doutorado*. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2013.

BORBELY, A.U. et al. Decorin and biglycan immunolocalization in non-villous structures of healthy and pathological human placentas. *Histopathology*, 64(5):616-25, 2014.

BOYD, J.D.; HAMILTON, W.J. *The Human Placenta*. Heffer, Cambridge; 1970. 365p.

BU, P.; YANG, P. MicroRNA 203 inhibits malignant melanoma cell migration by targeting versican. *Experimental and therapeutic medicine*, v. 8, n. 1, p. 309-315, 2014.

BUDURU, S. et al. RNA interference: new mechanistic and biochemical insights with application in oral cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 13:3397-3409, 2018.

BUKONG, T.N. et al. Versican: a novel modulator of hepatic fibrosis. *Laboratory investigation*, v. 96, n. 3, p. 361, 2016.

BULMER, J.N.; WILLIAMS, P.J.; LASH, G.E. Immune cells in the placental bed. *The International Journal of Developmental Biology*, 54:281–94, 2010.

BURNS, T.A, et al. Imbalanced Expression of *Vcan* mRNA Splice Form Proteins Alters Heart Morphology and Cellular Protein Profiles. *Plos One*. 9(2): e89133, 2014.

BURROWS, T.D.; KING, A.; LOKE, Y. W. Trophoblast migration during human placental implantation. *Human Reproduction Update*, v. 2, p. 307–321, 1996.

CAMENISCH, T. D. *et al.* Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *Journal of Clinical Investigation*, v. 106, n. 3, p. 349, 2000.

CARTHY, J. M. *et al.* Versican localizes to the nucleus in proliferating mesenchymal cells. *Cardiovascular Pathology*, Volume 24, Issue 6, 368 – 374, 2015.

CARVALHO, H.F.; RECCO-PIMENTEL, S.M. *A célula*. São Paulo: Manole Ltda; 2001.

CATTARUZZA, S. *et al.* Distribution of PG-M/versican variants in human tissues and de novo expression of isoform V3 upon endothelial cell activation, migration and neoangiogenesis *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*. 277(49):47626-35, 2002.

CATTARUZZA, S. *et al.* The globular domains of PG-M/versican modulate the proliferation–apoptosis equilibrium and invasive capabilities of tumor cells. *The FASEB journal*, v. 18, n. 6, p. 779-781, 2004.

CHAKRABORTY, C. *et al.* Regulation of human trophoblast migration and invasiveness. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, v. 80, n. 2, p. 116-124, 2002.

CHEN, S.J.; LIU, Y. L.; SYTWU, H.K. Immunologic regulation in pregnancy: from mechanism to therapeutic strategy for immunomodulation. *Clinical & developmental immunology*, 2012, 258391, 2011.

CHOOCHEEP, K. *et al.* Versican Facilitates Chondrocyte Differentiation and Regulates Joint Morphogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285(27), p. 21114–21125, 2010.

CORPS, A.N. *et al.* Versican splice variant messenger RNA expression in normal human Achilles tendon and tendinopathies. *Rheumatology*. 43(8):969-72, 2004.

CORVINUS, F.M. *et al.* Evidence for a correlation between trophoblast invasiveness and STAT3 activity. *American Journal of Reproductive Immunology*. v. 50, p. 316-21, 2003.

CREIGHTON, C.J. *et al.* Analysis of tumor-host interactions by gene expression profiling of lung adenocarcinoma xenografts identifies genes involved in tumor formation. *Molecular cancer research*, v. 3, n. 3, p. 119-129, 2005.

CROUSE, J. *et al.* Type I Interferons Protect T Cells against NK Cell Attack Mediated by the Activating Receptor NCR1. *Immunity*, 40(6):961-73, 2014.

CUI, M., AU, J.L., WIENTJES, M.G. *et al.* Intravenous siRNA Silencing of Survivin Enhances Activity of Mitomycin C in Human Bladder RT4 Xenografts. *The Journal of urology*. vol. 194,1: 230-7. doi:10.1016/j.juro.2015.02.036. 2015.

DASILVA-ARNOLD, S. C. *et al.* Human trophoblast epithelial-mesenchymal transition in abnormally invasive placenta. *Biology of Reproduction*, Volume 99, Issue 2, 409–421, 2018.

DAVE, B. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance. *Breast Cancer Research*, v. 14, n. 1, p. 202, 2012.

DAVIES, E. J, POLLHEIMER, J., YONG, H.E., *et al.* Epithelial-mesenchymal transition during extravillous trophoblast differentiation. *Cell adhesion & migration*. 10(3):310–321, 2016.

DAY, A.J., DE LA MOTTE, C.A. Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? *Trends in Immunology*, 26:637–643, 2005.

DE OLIVEIRA, L. G. *et al.* Role of interleukin 8 in uterine natural killer cell regulation of extravillous trophoblast cell invasion. *Placenta*, 31:595–601. 2010.

DE WIT, M. *et al.* Lumican and versican protein expression are associated with colorectal adenoma to carcinoma progression. *PloS one*, v. 12, n. 5, p. e0174768, 2017.

DESJARDINS, M. *et al.* Versican regulates metastasis of epithelial ovarian carcinoma cells and spheroids. *Journal of Ovarian Research*, 7:70, 2014.

DISCHER, D.E.; MOONEY, D.J.; ZANDSTRA, P.W. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*. v. 324(5935), p. 1673-1677, 2009.

DING J., HUANG F., WU G. *et al.* MiR-519d-3p Suppresses Invasion and Migration of Trophoblast Cells via Targeting MMP-2. *PLoS ONE* 10(3): e0120321. doi:10.1371/journal.pone.0120321. 2015.

DOMENZAIN, C. *et al.* Differential expression of versican isoforms is a component of the human melanoma cell differentiation process. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1642, n. 1-2, p. 107-114, 2003.

DOMINGUEZ, F. *et al.* CXCL10 and IL-6 induce chemotaxis in human trophoblast cell lines. *Molecular Human Reproduction*, 14:423–430, 2008.

DOMOKOS, D. *et al.* Alteration in expressions of RhoA and Rho-kinases during pregnancy in rats: Their roles in uterine contractions and onset of labour. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, 68(3):439-451, 2017.

DU, W.W; YANG, W., YEE, A.J. Roles of versican in cancer biology- tumorigenesis, progression and metastasis. *Histology and Histopathology*. 28(6):701-13, 2013.

DYCK, S. M.; KARIMI-ABDOLREZAEI, S. Chondroitin sulfate proteoglycans: Key modulators in the developing and pathologic central nervous system. *Experimental Neurology*, v. 269, p. 169-187, ISSN 0014-4886, 2015.

ERDELYI, I. *et al.* Expression of versican in relation to chondrogenesis-related extracellular matrix components in canine mammary tumors. *Histochemistry and cell biology*, v. 124, n. 2, p. 139-149, 2005.

ERLEBACHER, A. Immunology of the Maternal-Fetal Interface, *Annual Review of Immunology*, 31:1, 387-411, 2013.

EVAN, G.I.; VOUSDEN, K.H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, v. 411, n. 6835, p. 342-348, 2001.

EVANKO, S.P. *et al.* Hyaluronan and versican in the control of human T-lymphocyte adhesion and migration. *Matrix Biology*, 31(2):90-100, 2012.

EVANKO, S.P. *et al.* Hyaluronan-Dependent Pericellular Matrix. *Advanced drug delivery reviews*. 59(13):1351-1365, 2007.

EVANKO, S.P.; ANGELLO, J. C.; WIGHT, T.N. Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 19:1004–1013, 1999.

FERRARI, L. F., *et al.* Extracellular Matrix Hyaluronan Signals Via its CD44 Receptor in the Increased Responsiveness to Mechanical Stimulation. *Neuroscience*, v. 324, p. 390-398, 2016.

FLUHR, H., KRENZER, S., STEIN, G. M. *et al.* Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  sensitize primarily resistant human endometrial stromal cells to Fas-mediated apoptosis. *Journal of Cell Science*. 120: 4126-4133; doi: 10.1242/jcs.009761. 2007.

FOX, H. Placenta accreta 1945–1969. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 27(7):475–490, 1972.

FRANK, H.G. *et al.* Immunohistochemistry of two different types of placental fibrinoid. *Cells Tissues Organs*, v. 150, n. 1, p. 55-68, 1994.

FREVERT, C.W. *et al.* Danger-Associated Molecular Patterns Derived From the Extracellular Matrix Provide Temporal Control of Innate Immunity. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2017.

FRIEL, A. M. *et al.* Rho A/Rho Kinase mRNA and Protein Levels in Human Myometrium During Pregnancy and Labor. *Journal of Society for Gynecologic Investigation*, 12(1):20-7, 2005.

FUJIWARA, H. *et al.* Regulation of human extravillous trophoblast function by membrane bound peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1751:26–32, 2005.

FULLERTON, J.N.; GILROY, D.W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nature reviews Drug discovery*, v. 15, n. 8, p. 551, 2016.

GAO, D. *et al.* Myeloid Progenitor Cells in the Premetastatic Lung Promote Metastases by Inducing Mesenchymal to Epithelial Transition. *Cancer Research*. (72) (6) 1384-1394, 2012.

GENBACEV, O.; McMASTER, M.T.; FISHER, S.J. A Repertoire of Cell Cycle Regulators Whose Expression Is Coordinated with Human Cytotrophoblast Differentiation. *The American Journal of Pathology*. v. 157, p. 1337 – 1351, 2000.

GENBACEV, O.D. *et al.* Trophoblast L-Selectin-Mediated Adhesion at the Maternal-Fetal Interface. *Science*. 405-408, 2003.

GHOSH, S. *et al.* Up-regulation of stromal versican expression in advanced stage serous ovarian cancer. *Gynecologic oncology*, v. 119, n. 1, p. 114-120, 2010.

GREENWOOD, J.D. *et al.* Ultrastructural studies of implantation sites from mice deficient in uterine natural killer cells. *Placenta*, 21:693–702, 2000.

GROTEN, T. *et al.* Differential expression of VE-cadherin and VEGFR2 in placental syncytiotrophoblast during preeclampsia – New perspectives to explain the pathophysiology. *Placenta*, Volume 31, Issue 4, 339 – 343. 2010.

HAIDER, S. *et al.* Notch1 controls development of the extravillous trophoblast lineage in the human placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(48), E7710-E7719, 2016.

HAMILTON, S.R. *et al.* The hyaluronan receptors CD44 and Rhamm (CD168) form complexes with ERK1,2 that sustain high basal motility in breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 282, 16667–16680, 2007.

HANNA, J., GOLDMAN-WOHL, D., HAMANI, Y. *et al.* Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal- maternal interface. *Nature Medicine*. 12:1065-1074, 2006;

HANNON, G. J. RNA interference. *Nature*, 418, p. 244–251, 2002.

HARRIS, L.K. Review: Trophoblast-Vascular Cell Interactions in Early Pregnancy: How to Remodel a Vessel. *Placenta*, Volume 31, S93 - S98, 2010.

HARTMANN, S.; RIDLEY, A. J.; LUTZ, S. The Function of Rho-Associated Kinases ROCK1 and ROCK2 in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease. *Frontiers in pharmacology*, 6, 276, 2015.

HASCALL, V.C., MAJORS, A.K., DE LA MOTTE, C.A. *et al.* Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation? *Biochimica et Biophysica Acta*; 1673:3–12, 2004.

HASCALL, V.C.; KIMURA, J.H. Proteoglycans: isolation and characterization. *Methods in Enzymology*. 82A:769-800, 1982.

HAVRE, P.A. *et al.* CD26 expression on T-anaplastic large cell lymphoma (ALCL) line Karpas 299 is associated with increased expression of versican and MT1-MMP and enhanced adhesion. *BMC Cancer* 13, 517, 2013.

HENDERSON, D.J., COPP, A.J. Versican expression is associated with chamber specification, septation, and valvulogenesis in the developing mouse heart. *Circulation Research*. 83(5):523-32, 1998.

HERNÁNDEZ, D. *et al.* Role of versican V0/V1 and CD44 in the regulation of human melanoma cell behavior. *International journal of molecular medicine*, v. 27, n. 2, p. 269-275, 2011a.

HERNÁNDEZ, D. *et al.* V3 versican isoform alters the behavior of human melanoma cells by interfering with CD44/ErbB-dependent signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 286(2):1475-85, 2011b.

HERNÁNDEZ, D.; DOCAMPO, M.J.; BASSOLS, A. VCAN (versican). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, 2010.

HIROSE, J. *et al.* Versican Interacts with Chemokines and Modulates Cellular Responses. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 5228, 2001.

HODGE, R.G., RIDLEY, A.J. Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.; 17:496–510. [PubMed: 27301673]. 2016.

HOWELL, M.D.; GOTTSCHALL, P.E. Lectican proteoglycans, their cleaving metalloproteinases, and plasticity in the central nervous system extracellular microenvironment. *Neuroscience*. 217:6-18, 2012.

HUANG, S., DING, C., MAI, Q. *et al.* Inhibition of Rho-associated protein kinase increases the ratio of formation of blastocysts from single human blastomeres. *Molecular Medicine Reports*; 13:2046–2052. [PubMed: 26783117]. 2016.

HUANG, R. *et al.* Inhibition of versican synthesis by antisense alters smooth muscle cell phenotype and induces elastic fiber formation in vitro and in neointima after vessel injury. *Circulation research*, v. 98, n. 3, p. 370-377, 2006.

HUPPERTZ, B. *et al.* Extracellular matrix components of the placental extravillous trophoblast: immunocytochemistry and ultrastructural distribution. *Histochem Cell Biol*, v. 106, n. 3, p. 291-301, 1996.

HUPPERTZ, B. *et al.* Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell and tissue research*, v. 291, n. 1, p. 133-148, 1997.

IGNEY, F.H.; KRAMMER, P.H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, v. 2, n. 4, p. 277-288, 2002.

IOZZO, R.V.; MURDOCH, A.V. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB Journal*. 10:598-614, 1996.

IOZZO, R.V.; SANDERSON, R.D. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15, 1013–1031, 2011.

IOZZO, R.V.; SCHAEFER, L. Proteoglycan form and function: a comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biology*, 42. 11–55, 2015.

IRVING, F.C.; HERTIG, A.T. A study of placenta accreta. *Surgery, Gynecology & Obstetrics*. v. 64, p. 178-200, 1937.

JANEWAY, C.A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*, v. 20, n. 1, p. 197-216, 2002.

JÄRVELÄINEN, H.; SAINIO, A.; KOULU, M.; WIGHT, T.N.; PENTTINEN, R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacological reviews*, 61(2), 198-223, 2009.

JOVANOVIĆ, M. *et al.* Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins alpha5 and beta1. *Reproduction*, 139:789–798, 2010.

JOVANOVIĆ, M.; VICOVAC, L. Interleukin-6 stimulates cell migration, invasion and integrin expression in HTR-8/SVneo cell line. *Placenta*, 30:320–328, 2009.

KADYROV, M. *et al.* Pre-eclampsia and maternal anaemia display reduced apoptosis and opposite invasive phenotypes of extravillous trophoblast. *Placenta*, 24:540–8, 2003.

KARMAKAR, S.; DHAR, R.; DAS, C. Inhibition of cytotrophoblastic (JEG-3) cell invasion by interleukin 12 involves an interferon gamma-mediated pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 279:55297–55307, 2004.

KARRE, K. *et al.* Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, 319(6055):675–8, 1986.

KAUFMANN, P.; CASTELUCCI, M. Extravillous trophoblast in the human placenta: a review. *Trophoblast Research. Early Pregnancy*. v. 10, p. 21-65, 1997.

KAWASHIMA, H., ATARASHI, K., HIROSE, M. *et al.* Oversulfated chondroitin/dermatan sulfates containing GlcA $\beta$ 1/IdoA $\alpha$ 1-3GalNAc(4,6-O-disulfate) interact with L- and P-selectin and chemokines. *The Journal of Biological Chemistry*; 277:12921–12930, 2002.

KAWASHIMA, H., HIROSE, M., HIROSE, J. *et al.* Binding of a large chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan, versican, to L-selectin, P-selectin, and CD44. *The Journal Biological Chemistry*. 275:35448–35456, 2000.

KEIRE, P.A. *et al.* A role of versican in the development of leiomyosarcoma. *The Journal of Biological Chemistry*. 289(49):34089-103, 2014.

KEMP, B. *et al.* Invasive depth of extravillous trophoblast correlates with cellular phenotype: a comparison of intra- and extrauterine implantation sites. *Histochemistry and Cell Biology*. v. 117, p. 401-14, 2002.

KENAGY, R.D.; PLAAS, A.H.; WIGHT, T.N. Versican degradation and vascular disease. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 16(6): 209-215, 2006.

KERN, C.B. *et al.* Proteolytic cleavage of versican during cardiac cushion morphogenesis. *Developmental dynamics*, v. 235, n. 8, p. 2238-2247, 2006.

KHONG, T. Y. *et al.* Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 93:1049–59. 1986.

KHONG, Y. The pathology of placenta accreta, a worldwide epidemic. *Journal of Clinical Pathology*. 61:243-6, 2008.

KIM, S. *et al.* Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature*. 457(7225):102-6, 2009.

KIM, Y. M. *et al.* Failure of physiologic transformation of the spiral arteries in patients with preterm labor and intact membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 189:1063–9, 2003.

KIRKPATRICK, C. A.; SELLECK, S. B. Heparan sulfate proteoglycans at a glance. *Journal of Cell Science*, 120: 1829-1832; 2007.

KISALUS, L.L.; HERR, J.C. Immunocytochemical localization of heparan sulphate proteoglycan in human decidual cell secretory bodies and placental fibrinoid. *Biology of Reproduction*. v. 39, p. 419-30, 1988.

KISCHEL, P. *et al.* Versican overexpression in human breast cancer lesions: known and new isoforms for stromal tumor targeting. *International Journal of Cancer*; 126(3):640-50, 2010.

KNÖFLER, M. *et al.* Regulation of Trophoblast Invasion – A Workshop Report. *Placenta*, 29(Suppl A):S26-S28, 2008.

KODAMA, J. *et al.* Prognostic significance of stromal versican expression in human endometrial cancer. *Annals of Oncology*, 18: 269-274, 2007a.

KODAMA, J. *et al.* Versican expression in human cervical cancer. *European Journal of Cancer*, 43(9):1460-6, 2007b.

KOEDRITH, P, AND YOUNG R. S. Enhancement of the efficacy of mitomycin C-mediated apoptosis in human colon cancer cells with RNAi-based thioredoxin reductase 1 deficiency. *Experimental and therapeutic medicine*. vol. 2,5: 873-878. doi:10.3892/etm.2011.304. 2011.

KOYAMA, H. *et al.* Hyperproduction of hyaluronan in neu-induced mammary tumor accelerates angiogenesis through stromal cell recruitment: possible involvement of versican/PG-M. *The American Journal of Pathology*. 170: 1086-1099, 2007.

KRAUS, F.T. *et al.* Disorders of placental development. Em: King DW (Ed.). Atlas of nontumor pathology, placental pathology. Washington DC: *Armed Forces Institute of Pathology*; 2004. p.47-74.

KUSUMOTO, T. *et al.* Clinical significance of syndecan-1 and versican expression in human epithelial ovarian cancer. *Oncology reports*, v. 23, n. 4, p. 917-925, 2010.

LABROPOULOU, V.T. *et al.* Versican but not decorin accumulation is related to metastatic potential and neovascularization in testicular germ cell tumours. *Histopathology*, v. 49, n. 6, p. 582-593, 2006.

LALA, P.K., CHAKRABORTY, C. Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: Possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injury. *Placenta*. 24:575–587, 2003.

LALA. P.K., GRAHAM, C.H. Mechanisms of trophoblast invasiveness and their control: The role of proteases and protease inhibitors. *Cancer Metastasis Reviews*. 9:369–379, 1990.

LANDOLT, R.M., *et al.* Versican is selectively expressed in embryonic tissues that act as barriers to neural crest cell migration and axon outgrowth. *Development*, 121(8):2303-12, 1995.

LASH, G.E., SCHIESSL, B., KIRKLEY, M. *et al.* Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. *Journal of Leukocyte Biology*; 80:572-580, 2006.

LAUER, M.E., ERZURUM, S.C., MUKHOPADHYAY, D. *et al.* Differentiated murine airway epithelial cells synthesize a leukocyte-adhesive hyaluronan matrix in response to endoplasmic reticulum stress. *The Journal of Biological Chemistry*; 283:26283–26296, 2008.

LAWN, A.M.; WILSON, E.W; FINN, C.A. The ultrastructure of human decidual and predecidual cells. *Journal of Reproduction and Fertility*. v. 26, p. 85-90, 1971.

LeBARON, R. G.; ZIMMERMANN, D. R; RUOSLAHTI, E. Hyaluronate binding properties of versican. *The Journal of Biological Chemistry*. 267: 10003, 1992,

LEE, D.H.; OH, J.H.; CHUNG, J.H. Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging. *Journal of Dermatological Science*. 83(3):174-81. doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.05.016, Epub 2016.

LEE, G.M. *et al.* The dynamic structure of the pericellular matrix on living cells. *The Journal of cell biology*, v. 123, n. 6, p. 1899-1907, 1993.

LEE, H.C. *et al.* Cancer metastasis and EGFR signaling is suppressed by amiodarone-induced versican V2. *Oncotarget*. 6(40):42976-87, 2015.

LEMIRE, J.M. *et al.* Overexpression of the V3 variant of versican alters arterial smooth muscle cell adhesion, migration and proliferation *in vitro*. *Journal of Cell Physiology*. 190(1):38-45, 2002.

LEMIRE, J.M. *et al.* Versican/Pg-M isoforms in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 19(7):1630-9, 1999.

LIBRACH, C.L. *et al.* Interleukin-1 beta regulates human cytotrophoblast metalloproteinase activity and invasion *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry*, 269:17125– 17131, 1994.

LIU, J.; CAO, X. Cellular and molecular regulation of innate inflammatory responses. *Cellular & molecular immunology*, v. 13, n. 6, p. 711, 2016.

LJUNGGREN, H.G.; KARRE, K. In search of the ‘missing self’: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology Today*, 11(7):237–44. 1990.

LOREGGER, T.; POLLHEIMER, J., KNÖFLER, M. Regulatory transcription factors controlling function and differentiation of human trophoblast-a review. *Placenta*. 24 Suppl A: S104-10, 2003.

LUNDELL, A., OLIN, A.I., MORGELIN, M. et al. Structural basis for interactions between tenascins and lectican C-type lectin domains: evidence for a crosslinking role for tenascins. *Structure*, 12:1495–1506. 2004.

LUO, J.L. *et al.* Inhibition of NF- $\kappa$ B in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNF $\alpha$  to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer cell*, v. 6, n. 3, p. 297-305, 2004.

LUO, L., YE, G., NADEEM, L. et al. MicroRNA-378a-5p promotes trophoblast cell survival, migration and invasion by targeting Nodal. *Journal of Cell Science* 125: 3124-3132; doi: 10.1242/jcs.096412. 2012.

MAEDA, N. Proteoglycans and neuronal migration in the cerebral cortex during development and disease. *Frontiers in neuroscience*, v. 9, p. 98, 2015.

MARGOLIS, R.U.; MARGOLIS, R.K. Aggrecan-versican-neurocan family proteoglycans. *Methods in Enzymology*, v. 245, p.105-26, 1994.

MCCULLOCH, D.R. *et al.* ADAMTS metalloproteases generate active versican fragments that regulate interdigital web regression. *Developmental cell*, v. 17, n. 5, p. 687-698, 2009.

MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, v. 431, n. 7006, p. 343, 2004.

MERRILEES, M.J. *et al.* Use of versicam variant V3 and versicam antisense expression to engineer cultured human skin containing increased content of insoluble elastin. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. doi: 10.1002/term.1913. [Em impressão], 2014.

MIQUEL-SERRA, L. *et al.* V3 versican isoform expression has a dual role in human melanoma tumor growth and metastasis. *Laboratory Investigation*, v. 86(9), p. 889–901, 2006.

MITSUI, Y. *et al.* Versican promotes tumor progression, metastasis and predicts poor prognosis in renal carcinoma. *Molecular Cancer Research*, v. 15, n. 7, p. 884-895, 2017.

MOFFETT, A.; LOKE, C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nature Reviews. Immunology*, 6(8):584–94, 2006.

MOGENSEN, T.H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews*, v. 22, n. 2, p. 240-273, 2009.

MORI, M. *et al.* The decidua—the maternal bed embracing the embryo—maintains the pregnancy. *Seminars in Immunopathology*. v. 38(6), p. 635-649, 2016.

MORSE, M.L. *et al.* Morbidade Materna Grave e Near Misses em Hospital de Referência Regional. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. São Paulo, v. 14, n. 2, p. 310-322, 2011.

MUKARATIRWA, S. *et al.* Versican and hyaluronan expression in canine colonic adenomas and carcinomas: relation to malignancy and depth of tumour invasion. *Journal of comparative pathology*, v. 131, n. 4, p. 259-270, 2004.

NADEEM L., MUNIR S., FU G., et al. Nodal signals through activin receptor-like kinase 7 to inhibit trophoblast migration and invasion: implication in the pathogenesis of preeclampsia. *The American journal of pathology*;178(3):1177–1189. doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.066. 2011.

NANDADASA, S.; FOULCER, S.; APTE, S.S. The multiple, complex roles of versican and its proteolytic turnover by ADAMTS proteases during embryogenesis. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*, 35, 34-41, 2014.

NASO, M.F. *et al.* Expression pattern and mapping of the murine versican gene (Cspg2) to chromosome 13. *Genomics*. 29(1):297-300, 1995.

NORMANNO, N., DE LUCA, A., BIANCO, C. *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*; 366 (1):2-16; 2006.

OLIN, K. L., *et al.* Lipoprotein lipase enhances the binding of native and oxidized low density lipoproteins to versican and biglycan synthesized by cultured arterial smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(49):34629-36, 1999.

ONKEN, J. *et al.* Versican isoform V1 regulates proliferation and migration in high-grade gliomas. *Journal of neuro-oncology*, v. 120, n. 1, p. 73-83, 2014.

PADRÃO UFAL DE NORMALIZAÇÃO /Enildo Marinho Guedes *et al.* (Org.) – Maceió: EDUFAL, 2013. 55 p.

PAIVA, P. *et al.* Interleukin-11 promotes migration, but not proliferation, of human trophoblast cells, implying a role in placentation. *Endocrinology*, 148:5566–5572, 2007.

PERISSINOTTO, D. *et al.* Avian neural crest cell migration is diversely regulated by the two major hyaluronan-binding proteoglycans PG-M/ versican and aggrecan. *Development*. 127(13):2823-42, 2000.

PIJNENBORG, R.; VERCRUYSSSE, L., HANSSENS, M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta*. v. 27, p. 939–958, 2006.

PIRES, K.S.N., SUN, S.Y., GONÇALVES, C.M. *et al.* Versican silencing in BeWo cells and its implication in gestational trophoblastic diseases. *Histochemistry and Cell Biology*, 0948-6143, p. 1-9, 2018.

PRUTSCH, N. *et al.* The role of interleukin-1b in human trophoblast motility. *Placenta*, 33:696–703, 2012.

RAHMANI, M. *et al.* Versican: signaling to transcriptional control pathways. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 84, 77–92, 2006.

RED-HORSE, K. *et al.* Trophoblast Differentiation during Embryo Implantation and Formation of the Maternal-Fetal Interface. *Journal of Clinical Investigation*. PMC. Web. 114.6: 744–754, 2004.

RICCIARDELLI, C. *et al.* Formation of hyaluronan-and versican-rich pericellular matrix by prostate cancer cells promotes cell motility. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 14, p. 10814-10825, 2007.

RICCIARDELLI, C. *et al.* The biological role and regulation of versican levels in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 28, n. 1-2, p. 233, 2009.

RICCIARDELLI, C.; RODGERS, R.J. Extracellular matrix of ovarian tumors. *Seminars in Reproductive Medicine*. 24(4):270-82, 2006.

RIDLEY, A.J., PATERSON, H.F., JOHNSTON, C.L. *et al.* The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*; 70:401-10; PMID:1643658; disponível em <[http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90164-8](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(92)90164-8)>. 1992.

RIDLEY, A.J., HALL, A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*; 70:389-99; PMID:1643657; disponível em <[http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90163-7](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(92)90163-7)>. 1992.

ROTH, I.; FISHER, S. J. IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP-9 production and invasion. *Developmental Biology*, v. 205, p. 194–204, 1999.

ROZARIO, T.; DeSIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Developmental Biology*, v. 341, p. 126-140, 2010.

RUOSLAHTI, E.; YAMAGUCHI, Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*. 64:867-9, 1991.

SAKKO, A.J. *et al.* Modulation of prostate cancer cell attachment to matrix by versican. *Cancer research*, v. 63, n. 16, p. 4786-4791, 2003.

SAKKO, A.J. *et al.* Versicam Accumulation in Human Prostatic Fibroblast Cultures Is Enhanced by Prostate Cancer Cell-derived Transforming Growth Factor  $\beta$ 1. *Cancer Research*. (61) (3) 926-930, 2001.

SALOMONSEN, L.A. *et al.* Complex Regulation of Decidualization: A Role for Cytokines and Proteases—A Review. *Placenta*. Volume 24, S76 - S85, 2003.

SAN MARTIN, S. *et al.* Small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) in uterine tissues during pregnancy in mice. *Reproduction*. v. 125, p. 585-95, 2003.

SAY, L. *et al.* Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis. *The Lancet Global Health*, Volume 2, Issue 6, p. e323 - e333, 2014.

SCHATZ, F., LOCKWOOD, C.J. Progesterin regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 in primary cultures of endometrial stromal and decidual cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 77:621–625, 1993

SCHMALFELDT, M. *et al.* Brain derived versicam V2 is a potent inhibitor of axonal growth. *Journal of Cell. Science*. v. 113, p. 807– 816, 2000.

SCHWARTZ, N.B.; DOMOWICZ, M. Proteoglycans in brain development. *Glycoconjugate Journal*, 21(6):329-41, 2004.

SELBI, W., DAY, A.J., RUGG, M.S. *et al.* Overexpression of hyaluronan synthase 2 alters hyaluronan distribution and function in proximal tubular epithelial cells. *Journal of the American Society of Nephrology*; 17:1553–1567, 2006<sup>a</sup>

SELBI, W., DE LA MOTTE, C., HASCALL, V. *et al.* BMP-7 modulates hyaluronan-mediated proximal tubular cell-monocyte interaction. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15:1199–1211, 2004.

SELBI, W., DE LA MOTTE, C.A., HASCALL, V.C. et al. Characterization of hyaluronan cable structure and function in renal proximal tubular epithelial cells. *Kidney International*, 70:1287– 1295, 2006b.

SERRA, M. et al. V3 versican isoform expression alters the phenotype of melanoma cells and their tumorigenic potential. *International Journal of Cancer*;114(6):879-86, 2005.

SHARMA, S.; GODBOLE, G. Decidual control of trophoblast invasion. *American Journal of Reproductive Immunology*, 75: 341–350, 2016.

SHENG, W. et al. The roles of versican V1 and V2 isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Molecular biology of the cell*, v. 16, n. 3, p. 1330-1340, 2005.

SHENG, W. et al. Versican mediates mesenchymal-epithelial transition. *Molecular biology of the cell*, v. 17, n. 4, p. 2009-2020, 2006.

SHIOKAWA, S. et al. Small Guanosine Triphosphatase RhoA and Rho-Associated Kinase as Regulators of Trophoblast Migration, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 87, Issue 12, Pages 5808–5816, 2002.

SHIROISHI, M. et al. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15):8856– 61, 2003.

SHUKLA, S. et al. Synthesis and organization of hyaluronan and versican by embryonic stem cells undergoing embryoid body differentiation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 58, n. 4, p. 345-358, 2010.

SILVER, R. M.; BARBOUR, K. D. Placenta Accreta Spectrum Accreta, Increta, and Percreta. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. Volume 42, Issue 2, p. 381-402, Elsevier. 2015.

SIPOS, F.; GALAMB, O. Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon. *World journal of gastroenterology: WJG*, v. 18, n. 7, p. 601, 2012.

SMITH, S.D. *et al.* Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *The American Journal of Pathology*, 174:1959–71, 2009.

SOTOODEHNEJADNEMATALAHI, F.; BURKE, B. Structure, function and regulation of versican: the most abundant type of proteoglycan in the extracellular matrix. *Acta Medica Iranica*. 740-250, 1735-9694, 2013.

STARK., J; KAUFMANN, P. Die basalplatte der reifen menschlichen placenta. III – Bindegewebs und deciduazellen. *Arch für Gynäkologie*. 213:185-201, 1973.

STORKUS, W.J. *et al.* Reversal of natural killing susceptibility in target cells expressing transfected class I HLA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(7):2361–4, 1989.

SUBRAMANIAM, V. *et al.* CD44 regulates cell migration in human colon cancer cells via Lyn kinase and AKT phosphorylation. *Experimental and Molecular Pathology*. 83, 207–215, 2007.

SULLIVAN, L.C. *et al.* The major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity. *Tissue Antigens*, 72(5):415–24, 2008.

SUMAN, P. *et al.* AP-1 transcription factors, mucin-type molecules and MMPs regulate the IL-11 mediated invasiveness of JEG-3 and HTR-8/SVneo trophoblastic cells. *PLoS One*, 7:e29745, 2012.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, v. 140, n.6, p. 805-820, 2010.

TALUSAN, P. *et al.* Analysis of intimal proteoglycans in atherosclerosis-prone and atherosclerosis-resistant human arteries by mass spectrometry. *Molecular & Cell Proteomics*, 4(9):1350-7, 2005.

THEOCHARIS, A.D. Human colon adenocarcinoma is associated with specific post-translational modifications of versican and decorin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1588(2): 165-172, 2002.

THEOCHARIS, A.D., *et al.* Insights into the key roles of proteoglycans in breast

THEOCHARIS, A.D., *et al.* Cell-matrix interactions: focus on proteoglycanproteinase interplay and pharmacological targeting in cancer. *The FEBS Journal*. 281, 5023–5042, 2014.

THEOCHARIS, A.D., *et al.* Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Volume 97, p. 4-27, 2016.

THEOCHARIS, A.D., *et al.* Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *The FEBS Journal*. 277, 3904–3923, 2010.

THIERY, J.P. *et al.* Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, v.139, n. 5, p. 871-890, 2009.

THIRKILL, T.L. *et al.* Macaque trophoblast migration is regulated by RANTES. *Experimental Cell Research*, v. 305, p. 355–364, 2005.

TOOLE, B.P. *et al.* Hyaluronan: a critical component of epithelial-mesenchymal and epithelial-carcinoma transitions. *Cells tissues organs*, v. 179, n. 1-2, p. 66-72, 2005.

TOUAB, M. *et al.* Versican is differentially expressed in human melanoma and may play a role in tumor development. *The American journal of pathology*, v. 160, n. 2, p. 549-557, 2002.

TRUNDLEY, A.; MOFFETT, A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens*, 63:1–12, 2004.

VARANOU, A., WITHINGTON, S.L., LAKASING, L., et al. The importance of cysteine cathepsin proteases for placental development. *Journal of Molecular Medicine*. 84:305–317, 2006.

VÍCOVAC, L., APLIN, J.D. Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation. *Acta Anatomica (Basel)*, 156(3):202-16; 1996.

W.W. DU, W. YANG, A.J. YEE. Roles of versican in cancer biology—tumorigenesis, progression and metastasis. *Histology and Histopathology*, 28;701–713, 2013.

WALLACE, A.E.; FRASER, R.; CARTWRIGHT, J.E. Extravillous Trophoblast and Decidual Natural Killer Cells: A Remodelling Partnership. *Human Reproduction Update*. PMC. Web. v.18.4, p. 458–471, 2012.

WANG, W. *et al.* Ligation of TLR2 by Versican: A Link Between Inflammation and Metastasis. *Archives of Medical Research*, v. 40, Issue 4, p. 321 – 323, 2009.

WANG, C., ZHU, X., LI, A. et al. S100A16 regulated by Snail promotes the chemoresistance of nonmuscle invasive bladder cancer through the AKT/Bcl-2 pathway. *Cancer management and research*. 11:2449–2456. doi:10.2147/CMAR.S196450. 2019.

WANG L, FUQING Z, ZHENG L, TONG Q. et al. Smac/DIABLO promotes mitomycin C-induced apoptosis of bladder cancer T24 cells. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*. Volume 26, Issue 3, pp 317–318. 2006.

WANG, Z. *et al.* Versican silencing improves the antitumor efficacy of endostatin by alleviating its induced inflammatory and immunosuppressive changes in the tumor microenvironment. *Oncology Reports* 33, no. 6:2981-2991, 2015.

WEEN, M.P. *et al.* Versican induces a pro-metastatic ovarian cancer cell behavior which can be inhibited by small hyaluronan oligosaccharides. *Clinical & experimental metastasis*, v. 28, n. 2, p. 113-125, 2011a.

WEEN, M.P.; OEHLER, M.K.; RICCIARDELLI, C. Role of versican, hyaluronan and CD44 in ovarian cancer metastasis. *International journal of molecular sciences*, v. 12, n. 2, p. 1009-1029, 2011b.

WEI, T. *et al.* Interleukin-17A promotes tongue squamous cell carcinoma metastasis through activating miR-23b/versican pathway. *Oncotarget*, 8(4), 6663-6680, 2017.

WERFEL, J. *et al.* How Changes in Extracellular Matrix Mechanics and Gene Expression Variability Might Combine to Drive Cancer Progression. Huang, S. (Ed.). *PLoS ONE*. 8(10): e76122, 2013.

WIGHT, T.N. Cell biology of arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis*. v. 9(1), p. 1-20, 1989.

WIGHT, T.N. *et al.* versican and the regulation of cell phenotype in disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1840(8):2441-51, 2014.

WIGHT, T.N.; MERRILEES, M. J. Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circulation Research*, v. 94(9), p. 1158-67, 2004.

WINTERHAGER, E. *et al.* Cell-cell-communication during placental development and possible implications for trophoblast proliferation and differentiation. *Placenta*, 2000.

WU, S.; KOCHERGINSKY, M.; HIBBARD, J.U. Abnormal placentation: twenty-year analysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 192(5):1458-61, 2005.

WU, Y. *et al.* Versican V1 isoform induces neuronal differentiation and promotes neurite outgrowth. *Molecular biology of the cell*, v. 15, n. 5, p. 2093-2104, 2004.

WU, Y. *et al.*  $\beta$ 1-Integrin-mediated glioma cell adhesion and free radical-induced apoptosis are regulated by binding to a C-terminal domain of PG-M/versican. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 14, p. 12294-12301, 2002.

WYNN, R.M. Electron microscopy of the developing decidua. *Fertility and Sterility*. v.16, p. 16-26, 1965.

XIE, D., CHEN, C.C., PTASZEK, L.M. *et al.* Rewirable gene regulatory networks in the preimplantation embryonic development of three mammalian species. *Genome Research*; 20:804–815. [PubMed: 20219939]. 2010.

YAMAMOTO-TABATA, T. *et al.* Human cytomegalovirus interleukin-10 downregulates metalloproteinase activity and impairs endothelial cell migration and placental cytotrophoblast invasiveness *in vitro*. *Journal of Virology*, v. 78, p. 2831–2840, 2004.

YAN, L., YANG, M., GUO, H. *et al.* Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nature Structural Molecular Biology*; 20:1131–1139. [PubMed: 23934149]. 2013.

YANG, J; WEINBERG, R.A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental cell*, v. 14, n. 6, p. 818-829, 2008.

YANG, M. *et al.* miR-15b-AGO2 play a critical role in HTR8/SVneo invasion and in a model of angiogenesis defects related to inflammation. *Placenta*, v. 41, p. 62-73, 2016.

YANG, X.; FAN, B.; GAO, W. *et al.* Enhanced endosomal escape by photothermal activation for improved small interfering RNA delivery and antitumor effect. *International Journal of Nanomedicine*, 13:4333-4344, 2018.

YEE, A.J.M. *et al.* The effect of versican G3 domain on local breast cancer invasiveness and bony metastasis. *Breast Cancer Research*, v. 9, n. 4, p. R47, 2007.

YEUNG, T. L. *et al.* TGF- $\beta$  modulates ovarian cancer invasion by upregulating CAF-derived versican in the tumor microenvironment. *Cancer Research*. 73, 5016–5028, 2013.

ZAKO, M. *et al.* Expression of PG-M(V3), an Alternatively Spliced Form of PG-M without a Chondroitin Sulfate Attachment Region in Mouse and Human Tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 3914, 1995.

ZHAO, X. *et al.* MiR-135a-5p modulates biological functions of thyroid carcinoma cells via targeting VCAN 3'-UTR. *Cancer Biomark.* 2017;20(2):207–216.

ZHENG, P.S. *et al.* Versican/PG-M G3 domain promotes tumor growth and angiogenesis. *The FASEB Journal*, 18(6):754-6, 2004.

ZIMMERMANN, D.R. *et al.* Versican is expressed in the proliferating zone in the epidermis and in association with the elastic network of the dermis. *The Journal of Cell Biology.* (5); 124:817-25, 1994.

ZIMMERMANN, D.R.; DOURS-ZIMMERMANN, M.T. Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochemistry and cell biology*, v. 130, n. 4, p. 635-653, 2008.

ZIMMERMANN, D.R.; RUOSLAHTI, E. Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. *The EMBO journal*, v. 8(10), 2975-81, 1989.

ZORN, T. M. T. *et al.* Biosynthesis of glycosaminoglycans in the endometrium during the initial stages of pregnancy of the mouse. *Cellular and molecular Biology*, 41, 97-106. 1995.

ZORN, T. M. T., BEVILACQUA, E. M. A. F., Abrahamsohn, P. A. Collagen remodeling during decidualization in the mouse. *Cell and Tissue Research*, 244, 443-448. 1986.

ZOU, Y. *et al.* Decorin-mediated inhibition of human trophoblast cells proliferation, migration, and invasion and promotion of apoptosis *in vitro*. *BioMed research international*, 2015.

ZYGMUNT, M. *et al.* Invasion of cytotrophoblastic (JEG-3) cells is up-regulated by interleukin-15 *in vitro*. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 40, p. 326–331, 1998.