

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

CAMILLA MENDES GONÇALVES

**O papel do Versicam na regulação da transição epitélio-mesenquimal e
motilidade de células trofoblásticas**

MACEIÓ

2024

CAMILLA MENDES GONÇALVES

O papel do Versicam na regulação da transição epitélio-mesenquimal de células trofoblásticas invasivas

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

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Urban

MACEIÓ

2024

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Girlaine da Silva Santos – CRB-4 – 1127

G635p Gonçalves, Camilla Mendes.

O papel do Versicam na regulação da transição epitélio-mesenquimal e motilidade de células trofoblásticas / Camilla Mendes Gonçalves. – 2024.
97 f.: il.: color

Orientador: Alexandre Urban Borbely.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2024.

Bibliografia: f. 83-97.

1. Silenciamento gênico - Versicam. 2. Transição epitélio mesenquimal. 3. Motilidade. 4. Trofoblasto. I. Título.

CDU: 618.3

Folha de Aprovação

CAMILLA MENDES GONÇALVES

O papel do Versicam na regulação da transição epitélio-mesenquimal de células trofoblásticas invasivas

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 10 de dezembro de 2024.

Prof. Dr. Alexandre Urban Borbely, Universidade Federal de Alagoas (Orientador)

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Vanessa Moraes Freitas, Universidade de São Paulo (Examinador Externo)

Prof. Dr. Rafael Brito da Silva, Universidade Federal Fluminense (Examinador Externo)

Prof^a. Dr^a. Marília O. F. Goulart, Universidade Federal de Alagoas (Examinador Interno)

Prof^a. Dr^a. Carolinne de Sales Marques, Universidade Federal de Alagoas (Examinador Interno)

Aos meus filhos Benício e Enrico, que são a razão de tudo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus filhos Benício e Enrico por serem a minha motivação diária;

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 marido Emanuel Felipe Lins Nascimento, por compartilhar uma vida comigo. Por acreditar e torcer por mim todos os dias;

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Urban Borbely, por todo suporte, confiança e disponibilidade ao longo de 10 anos de parceria.

Às minhas amigas e companheiras de trabalho, Ana Lúcia Mendes, Eloiza Tanabe, Keyla Nobre, Rayane Botelho, Ana Flávia Silva, por serem as pessoas mais incríveis que eu poderia ter por perto. Pelas risadas, conversas, conselhos e momentos compartilhados;

Às integrantes do Grupo de Pesquisa da Saúde da Mulher e Gestação, minhas *trofogirls*, em especial à Ashelley Sousa, Mariana Dutra e Lays Xavier pela contribuição no desenvolvimento desta pesquisa. Por todo comprometimento, parceria, apoio e por serem a melhor equipe de trabalho;

A todos os meus colegas do Laboratório de Biologia Celular por todo conhecimento compartilhado, incentivo e companheirismo durante 10 anos.

À Prof^a. Dr^a Vanessa Moraes Freitas, Prof. Dr. Rafael Brito e Prof. Dr. Eduardo Fonseca pela valorosa colaboração para o desenvolvimento deste trabalho;

A todos que não foram aqui citados, mas de alguma maneira contribuíram e influenciaram mudanças e vivências que me tornaram a pessoa que sou hoje, minha eterna gratidão.

RESUMO

Introdução: O versicam é um proteoglicano conhecido por ativar vias de sinalização intracelulares envolvidas na inflamação, proliferação, migração, invasão, adesão, organização de citoesqueleto e transição epitélio-mesenquimal (TEM). A TEM se caracteriza pela diferenciação morfológica e funcional, que ocorre em diversas situações fisiológicas e patológicas, sendo muito estudada por seu papel fundamental nas metástases neoplásicas, também sendo essencial para que as células trofoblásticas possam invadir os tecidos maternos e estabelecer a interface materno-fetal no primeiro trimestre. **Objetivo:** Investigar se o silenciamento gênico de versicam influencia processos de transição epitélio-mesenquimal e motilidade de células trofoblásticas *in vitro*. **Metodologia:** Células HTR-8/SVneo foram silenciadas para o versicam, e sua eficiência foi testada nos níveis de mRNA e proteína. Foram realizados *Western Blot*, citometria de fluxo e imunofluorescência para AKT, mTOR, IRF3 e IRF9 após 24 horas de silenciamento versicam. A invasão celular foi examinada usando ensaios de invasão em modelos 3D. Por meio de microscopia *time lapse*, foi avaliada a direcionalidade celular. A Microscopia de Força Atômica foi realizada para topografia celular e elasticidade da membrana plasmática. Diferentes marcadores de TEM foram avaliados por RT-PCR e imunofluorescência. **Resultados:** O silenciamento gênico de versicam foi eficiente em células HTR-8/SVneo, e as análises da via de sinalização não mostraram diferenças na expressão de p-AKT Thr308 e p-mTOR, embora p-AKT Ser473, p-IRF3 e IRF9 tenham aumentado após 24 horas de silenciamento ($p < 0,05$). As células silenciadas exibiram padrões incomuns de direcionalidade de migração, aumento da expressão de pFAK e tiveram capacidade invasiva reduzida em ensaios de invasão em cocultura ($p < 0,05$). As células silenciadas apresentaram menor quantidade de fibras de estresse de F-actina, e seu Módulo de Young foi mais elevado ($p < 0,01$), indicando perda de elasticidade, assim como tiveram sua altura reduzida. Adicionalmente, diferentes marcadores de TEM, tais como TGF- β 2, E-caderina, β -catenina, Snail e vimentina foram alterados pelo silenciamento gênico de versicam. **Conclusão:** O silenciamento de versicam influencia significativamente as células HTR-8/SVneo em níveis moleculares e funcionais, afetando principalmente sua motilidade e perfil de TEM.

Palavras-chave: Versicam; Transição epitélio-mesenquimal; Motilidade.

ABSTRACT

Introduction: Versican is a proteoglycan known for activating intracellular signaling pathways involved in inflammation, proliferation, migration, invasion, adhesion, cytoskeleton organization, and epithelial-mesenchymal transition (EMT). EMT is characterized by morphological and functional differentiation, occurring in various physiological and pathological situations, extensively studied for its fundamental role in neoplastic metastases and essential for trophoblastic cells to invade maternal tissues and establish the maternal-fetal interface in the first trimester. **Objective:** To investigate whether gene silencing of versican influences epithelial-mesenchymal transition processes and trophoblastic cell motility *in vitro*. **Methods:** HTR-8/SVneo cells were silenced for versican, and efficiency was tested at mRNA and protein levels. Western Blot, flow cytometry and immunofluorescence were performed for AKT, mTOR, IRF3, and IRF9 after 24 hours of versican silencing. Cell invasion was examined using 3D invasion assays. Cell directionality was evaluated through time-lapse microscopy. Atomic Force Microscopy was conducted for cellular topography and membrane elasticity. Different EMT markers were assessed by RT-PCR and immunofluorescence. **Results:** Gene silencing of versican was efficient in HTR-8/SVneo cells, and signaling pathway analyses showed no differences in p-AKT Thr308 and p-mTOR expression, although p-AKT Ser473, p-IRF3, and IRF9 increased after 24 hours of silencing ($p < 0.05$). Silenced cells exhibited unusual migration directional patterns, increased pFAK expression and had reduced invasive capacity in co-culture invasion assays ($p < 0.05$). Silenced cells showed a lower amount of F-actin stress fibers, and their Young's Modulus was higher ($p < 0.01$), indicating loss of elasticity, as well as reduced height. Additionally, different markers of TEM, such as TGF- β 2, E-cadherin, β -catenin, Snail, and vimentin, were altered by versican gene silencing. **Conclusion:** Versican silencing significantly influences HTR-8/SVneo cells at molecular and functional levels, primarily affecting their motility and EMT profile.

Keywords: Versican; Epithelial-mesenchymal transition; Motility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura geral da matriz extracelular.....	21
Figura 2 - Estrutura geral de proteoglicanos da família dos lecticanos.	24
Figura 3 - Isoformas de versicam	26
Figura 4 - Representação estrutura de <i>versikine</i>	30
Figura 5 - Mecanismos gerais que coordenam a TEM	39
Figura 6 - Ação do silenciamento gênico na célula	46
Figura 7 - Análise da expressão gênica e proteica de versicam por RT-PCR e citometria de fluxo em células HTR-8/SVneo	55
Figura 8 - Níveis de versicam solúvel em células HTR-8/SVneo por ELISA	56
Figura 9 - Avaliação de vias de sinalização por <i>western blot</i>	57
Figura 10 - Imunofluorescências para vias de sinalização	59
Figura 11 - Análise FACS para vias de sinalização.....	60
Figura 12 - Perfil de direcionalidade de células HTR-8/SVneo.....	62
Figura 13 - Expressão de FAK e pFAK Tyr576 por imunofluorescência	63
Figura 14 - Análise de invasão celular em dispositivo <i>Transwell</i> em <i>coating</i> de Matrigel e células da linhagem EA.hy926	65
Figura 15 - Análise de parâmetros morfológicos por Microscopia de Força Atômica (AFM)	67
Figura 16 - Análise morfológica de citoesqueleto de F-actina e topográfica em células HTR-8/SVneo	69
Figura 17 - Expressão gênica de marcadores de TEM	71
Figura 18 - Expressão de marcadores de TEM por imunofluorescência	73

Figura 19 - Esquema representativo dos componentes celulares afetados pelo silenciamento gênico de VCAN em células trofoblásticas da linhagem HTR-8/SVneo	81
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Localização e principais funções das isoformas de versicam.....	28
Tabela 2 – Tipos de TEM e suas principais características.....	34
Tabela 3 - Sequências de <i>primers</i> para mRNA de GAPDH, isoformas de versicam e marcadores de TEM.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAMTS - Metaloproteinase com motivos de trombospondina

AIP – Placenta Anormalmente Invasiva

AKT – Proteína quinase B

ASMCs – Células de músculo liso arterial

BSA – Albumina de soro bovino

BMP – proteína morfogenética óssea

CAF – Fibroblastos associados ao câncer

CD – Grupamento de diferenciação

cDNA – DNA complementar

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

ERO – Espécie reativa de oxigênio

EVT – Citotrofoblasto extraviloso

FAK – Quinase de adesão focal

FAP – Proteína de ativação de fibroblastos

FITC – Fluoresceína isotiocianato

FGF – fator de crescimento de fibroblastos

FSP1 – proteína específica de fibroblasto 1

GAG – Glicosaminoglicano

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato

GSK-3 β – Quinase de síntese de glicogênio 3 beta

GTP – Trifosfato de guanosina

HA – Ácido hialurônico

hCG – Gonadotrofina coriônica humana

HGF – fator de crescimento de hepatócitos

HLA – Antígeno leucocitário humano

IFN – Interferon

IRF – Fator regulador de interferon

IRF3 – Fator regulador de interferon 3

IRF9 – Fator regulador de interferon 9

LEF – Fator de ligação ao intensificador linfóide (*lymphoid enhancer fator*)

LiCl – Cloreto de lítio

MEC – Matriz extracelular

MET – Transição mesenquimal-epitelial

MMP – Metaloproteinase de matriz

mRNA - Ácido ribonucléico tipo mensageiro

PBS – Tampão fosfato salina

PCR – Reação em cadeia de polimerase

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

PE – Ficoeritrina

PG – Proteoglicano

PSGL-1 – Glicoproteína ligante da P-selectina 1

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

SBF – Soro bovino fetal

SCF – fator de células-tronco

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

siVCAN – Silenciado para versicam

TCF – Fator de célula T (*T-Cell Factor*)

TGF- β – Fator de crescimento transformador beta

TIMP – Inibidor tecidual de metaloproteinase

TLR – Receptor tipo *Toll-like*

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TRITC - Isotiocianato de tetrametilrodamina

VCAN – Versicam

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

VGF – Fator de crescimento nervoso

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Matriz Extracelular	21
2.2 Proteoglicanos	22
2.3 Versicam	24
2.3.1 Estrutura Molecular e Funções	25
2.3.2 Versicam e Motilidade Celular	30
2.4 Transição Epitélio-Mesenquimal (TEM)	31
2.4.1 Classificação da TEM	32
2.4.2 Marcadores e mecanismos moleculares da TEM	34
2.4.3 Transição epitélio-mesenquimal na gestação	39
2.4.4 Versicam e a TEM	41
3 OBJETIVOS	44
4 METODOLOGIA	45
4.1 Cultura de células	45
4.2 Silenciamento gênico para o versicam	45
4.3 Ensaio Imuno Enzimático (ELISA) para versicam	47
4.4 Análise por <i>Western blot</i>	47
4.5 Análise por citometria de fluxo	48
4.6 Ensaio de videomicroscopia <i>Time-lapse</i> para análise de direcionalidade celular	49
4.7 Ensaio de invasão em cocultura 3D	49
4.8 Marcação para faloidina	50
4.9 Análise por Microscopia de Força Atômica (AFM)	50
4.10 Extração de RNA e RT-PCR semi-quantitativo	51
4.11 Imunofluorescência	52
4.12 Análises Estatísticas	53
5 RESULTADOS	54
5.1 Eficiência do silenciamento gênico para versicam	54
5.2 Análise de sinalização celular por <i>western blot</i> e citometria de fluxo	56
5.3 Análise de direcionalidade celular	61
5.4 Análise de adesão celular	62
5.5 Análise de invasão celular em Matrigel	63

5.6 Análise por Microscopia de Força Atômica (AFM)	66
5.7 Análise de sinalização de TEM por RT-PCR e imunofluorescência.....	70
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

Os proteoglicanos (PGs) são biomacromoléculas presentes em uma variedade de tecidos nos animais, constituídas por um cerne proteico e ligadas covalentemente a esta porção proteica, por cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs), conferindo a estas moléculas, grande diversidade estrutural e funcional (Song *et al.*, 2021). Ainda, os PGs são considerados os principais componentes presentes na matriz extracelular (MEC) e são capazes de interagir com fatores de crescimento, quimiocinas e receptores de superfície das células, além disso, podem ser classificados de acordo com sua localização na MEC, em: intracelulares, de superfície celular, pericelulares, extracelulares, e proteínas matricelulares (Birbrair, 2020).

Classificado como um proteoglicano extracelular, e o maior membro da família dos hialectanos (PGs que possuem sítios de ligação ao ácido hialurônico e a lectina), o versican (VCAN) é o PG mais abundante na MEC e expresso em uma variedade de tecidos (Tang *et al.*, 2022; Theocharis *et al.*, 2016). Ainda, o VCAN possui propriedades estruturais que permitem uma organização e hidratação da MEC, permitindo a criação de 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.*, 2017).

Esse proteoglicano também é conhecido por possuir cinco variantes de *splicing*: V0, V1, V2, V3 (Keire *et al.*, 2014) e V4 (Kischel *et al.*, 2010). Além de suas propriedades estruturais na matriz extracelular, o VCAN vem sendo descrito como uma importante molécula sinalizadora autocrinamente e paracrinamente, induzindo proliferação, migração, invasão e metástase de células neoplásicas (Wight *et al.*, 2014). 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.*, 2016) 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 VCAN é passível de clivagem, mediada por enzimas tipo desintegrina semelhante a proteoglicano e metaloproteinase com motivos de trombospondina-1

(ADAMTS) e metaloproteinases de matriz (MMPs) gerando, dessa forma, fragmentos bioativos (Timms e Maurice, 2020). A maior parte dos fragmentos gerados a partir da clivagem do VCAN possui o domínio G1 de sua estrutura, contendo o sítio de ligação com ácido hialurônico, sendo o fragmento mais conhecido, o *versikine* (Deb *et al.*, 2022; Timms e Maurice, 2020). Há diferentes funções biológicas relacionadas a atuação dos fragmentos bioativos de VCAN já reconhecidos, dentre elas estão: regulação da TEM, proliferação, remodelação de MEC, além de atuar na migração e invasão celular durante o desenvolvimento e em diferentes patologias, no entanto, a bioatividade destes fragmentos pode variar a depender do contexto onde atuam (Timms e Maurice, 2020; Wight *et al.*, 2020). Ademais, o *versikine* possui propriedades imunomodulatórias, atuando também como DAMP e interagindo com células do sistema imune ou não, e estimulando a produção e liberação de citocinas de perfil inflamatório ou anti-inflamatório (Wight *et al.*, 2020).

O VCAN também influencia funções e comportamentos celulares por meio de interações mediadas pelo domínio G3 com o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF-R) (Binder *et al.*, 2017; Roedig *et al.*, 2020). 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.*, 2020).

Além dos efeitos pró-inflamatórios, a interação de versicam com os receptores relatados pode gerar um aumento de fenótipo mesenquimal migratório (Zhang *et al.*, 2019; Timms e Maurice, 2020; Hirani *et al.*, 2021), 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 (Alarcon e Mirikawa, 2022).

As células trofoblásticas realizam a invasão necessária para uma correta placentação. Em uma primeira onda de invasão, o sinciotrofoblasto invade a decídua basal, estabelecendo uma interface materno-fetal primordial (Boyd e Hamilton, 1970; Zhang *et al.*, 2023). Em uma segunda onda de invasão, células do citotrofoblasto viloso transpassam os limites das vilosidades coriônicas, se diferenciando nas células

do citotrofoblasto extraviloso (EVT) (Dhar, 2021), 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, sendo capazes de remodelar estes vasos (Zhang, 2022; Sun *et al.*, 2021). O comportamento das células EVT é muito semelhante ao de células neoplásicas, entretanto essa invasão é altamente controlada temporal e espacialmente (Wallace *et al.*, 2012; Dhar, 2021). Esse controle na invasão, em gestações normais, é realizado 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 (Varberg e Soares, 2021; Garrido-Goméz *et al.*, 2022).

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 espectro da placenta acreta (do inglês "*Placenta Accreta Spectrum*") caracterizada pela reação decidual ausente ou defeituosa, mantendo o estroma endometrial como um tecido conjuntivo frouxo (Jauniaux *et al.*, 2021), fato que por muitos anos foi creditado ser a causa primária da invasão exacerbada das células EVT e consequentemente, do PAS. No entanto, estudos mais recentes, que comparam a placentação normal com o PAS, relacionaram esta doença placentária com diferentes condições, tais como expressão diferencial de genes relacionados à transição epitélio-mesenquimal e invasão celular, inflamação exacerbada na interface materno-fetal, angiogênese e hipóxia (Da Silva-Arnold *et al.*, 2018; McNally *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2022; Shinker *et al.*, 2020). Particularmente de alta severidade, o PAS não possui biomarcadores específicos, tendo diagnóstico difícil (possuindo altos índices de subdiagnóstico e subnotificação), e seu 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 para sua detecção (Arakaza *et al.*, 2023).

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, além de contribuir para a placentação e crescimento fetal, em humanos, por favorecer a proliferação de células *natural killers* uterinas e a dilatação de artérias espiraladas uterinas (San Martin *et al.*, 2003; Miyazaki *et al.*, 2019; Sagae *et al.*, 2023). 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 (Pires e Gonçalves *et al.*, 2018). Por conseguinte, visto que o versicam demonstra possuir um papel importante para a invasão das células trofoblásticas no primeiro trimestre e na PAS, assim como a carência de modelos para se estudar o comportamento da célula EVT no PAS, 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 comumente caracterizada como uma rede tridimensional e não celular, composta por fibras colágenas e elásticas, proteínas, proteoglicanos (PGs), glicosaminoglicanos (GAGs), laminina, fibronectina, elastina e outras moléculas que interagem entre si para formar uma estrutura altamente dinâmica (**Fig. 1**), capaz de fornecer suporte estrutural e bioquímico para as células (Theocharis *et al.*, 2016; Walker *et al.*, 2018). Por ser uma estrutura com alta dinamicidade, a MEC, constantemente passa por um processo de remodelação, através da ação de proteinases, seus componentes são degradados e modificados. O equilíbrio entre essa degradação e remodelação, é organizado pelas próprias células que estão presentes na MEC e é fundamental para a manutenção da homeostase nos tecidos (Walker *et al.*, 2018).

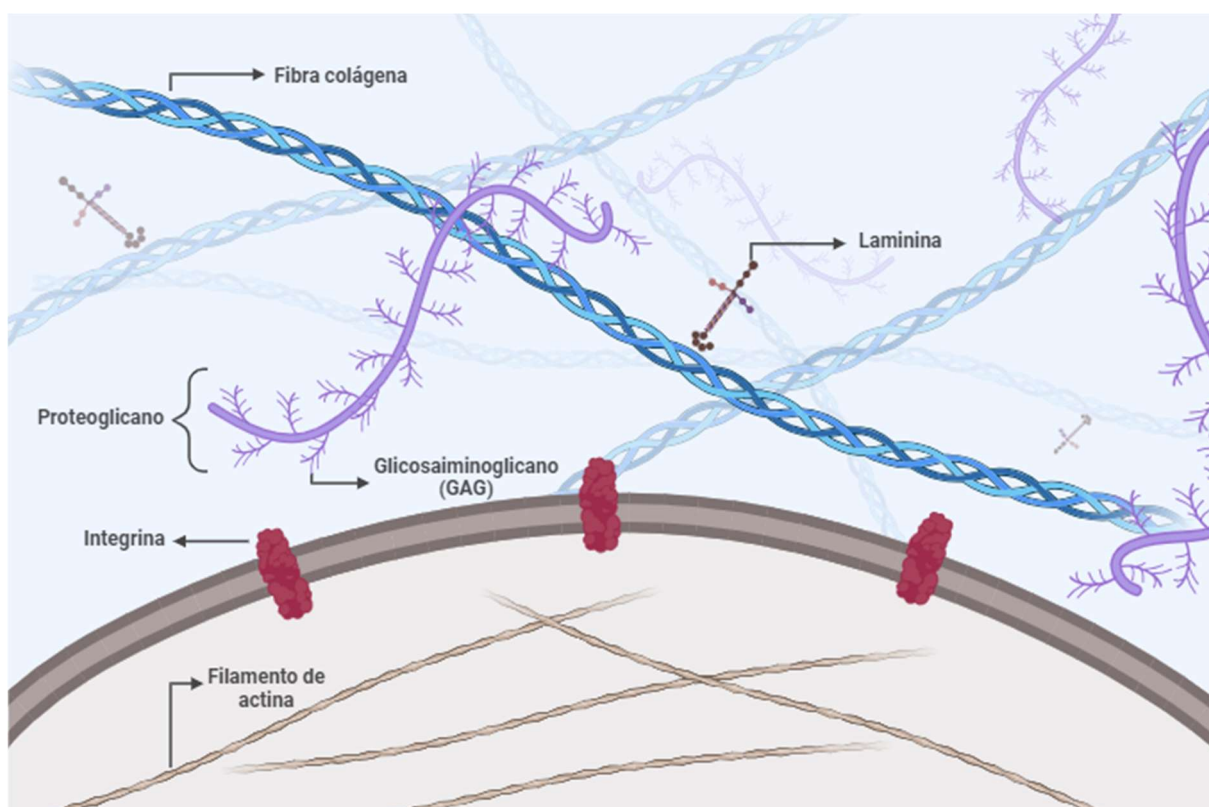


Figura 1. Estrutura geral da matriz extracelular. Esquema representativo com os principais componentes de MEC. Fonte: adaptado de Soles e colaboradores, 2023.

Variações na composição e estrutura dos componentes da MEC afetam tanto a estrutura geral quanto as propriedades biomecânicas da rede formada (Walker *et al.*,

2018). Esta estrutura não-celular e macromolecular é capaz de interagir com células circunvizinhas, além de estimular a comunicação e regular, dinamicamente processos como proliferação, adesão, migração, sobrevivência e diferenciação celular (Kai *et al.*, 2019). As células interagem com a MEC através de seus receptores de superfície, como integrinas, PGs de superfície celular e o CD44, receptor de ácido hialurônico (HA), por exemplo. Além disso, a MEC tem a capacidade de modular, localmente, a ação de fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e outras moléculas de sinalização, como WNTs, o fator de crescimento transformador- β (TGF β) (Bonnans *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2022).

Uma variedade de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas são constantemente depositados na MEC por meio da ligação a moléculas específicas, sendo resultado de processos altamente regulados, podendo, assim, operar em momentos relevantes para o desenvolvimento e a fisiologia dos tecidos (Kirkpatrick *et al.*, 2007; Rozario e Desimone, 2010; Cai *et al.*, 2021). A MEC que compõe cada tecido é essencial para a homeostase normal, mas também pode desempenhar um papel em muitas síndromes e condições patológicas/letais que surgem de anormalidades de seus componentes, o que coloca as moléculas do MEC como potenciais alvos para tratamentos farmacológicos direcionados (Vennin *et al.*, 2020).

2.2 Proteoglicanos

Os proteoglicanos (PGs) são moléculas que compõe estruturalmente a MEC, e se caracterizam como biomacromoléculas funcionais, extremamente heterogêneas e tão importantes quanto as fibras colágenas e elásticas, e que são distribuídos pelos tecidos de forma onipresente (Dong Hun Lee *et al.*, 2016; Iozzo e Sanderson, 2011). Presentes abundantemente na MEC, essas moléculas podem desempenhar uma variedade de funções, atuando como moduladores dinâmicos e integrantes das principais cascatas de sinalização que governam o comportamento celular. Os PGs podem agir como correceptores fatores de crescimento e quimiocinas, interagir com enzimas as quais são capazes de remodelar a MEC (Karamanos *et al.*, 2021) e interferir nas propriedades celulares integrais, tais como adesão, migração, proliferação, angiogênese, e sobrevivência, além de processos como hidratação dos tecidos, montagem supramolecular, homeostase, desenvolvimento, cicatrização e

reparo tecidual, senescência, inflamação e autofagia (Korpetinou *et al.*, 2014; Karamanos *et al.*, 2021).

Estruturalmente, os PGs são uma classe singular de glicoconjugados caracterizados pela presença de cadeias de glicosaminoglicanos (GAG) polissulfatadas e ligadas de forma covalente a uma ou mais regiões de uma proteína central (Critcher e Huang, 2022) (**Fig. 2**). A nível de classificação, essas moléculas recentemente tem sido categorizadas em quatro diferentes famílias, conforme sua localização celular ou subcelular, homologia de sequência de proteínas, e presença de porções proteicas exclusivas em intracelulares, de superfície celular, pericelulares de membrana basal ou extracelulares (Iozzo e Schaefer, 2015). Além de serem distinguidos pelas estruturas das proteínas centrais, os PGs podem apresentar diferentes combinações de cadeias de GAGs. Estas cadeias de glicosaminoglicanos se organizam em domínios sulfatados ou não, e são formadas por sequências repetidas de sulfato de condroitina (CS), sulfato de heparana e heparina (HS), sulfato de queratana (KS) ou sulfato de dermatana (DS) (Critcher e Huang, 2022; Merry *et al.*, 2022). Tais padrões de sulfatação e organização nas cadeias GAGs laterais determinam diferentes variantes estruturais de PGs que podem assumir uma variedade de funções em diferentes tecidos e células (Nguyen e Panitch, 2022; Merry *et al.*, 2022).

Dentre os PGs de matriz extracelular, a subfamília dos proteoglicanos ligantes ao ácido hialurônico (HA) ou lectina, também reconhecidos como hialectanos, se destaca por ser amplamente estudada e devido ao seu envolvimento em diversas funções regulatórias de fenômenos celulares. São componentes dessa subfamília os PGs: agrecan, neurocan, brevican e versican, quem compartilham uma série de características estruturais (Theocharis *et al.*, 2016; Fontanil *et al.*, 2021).

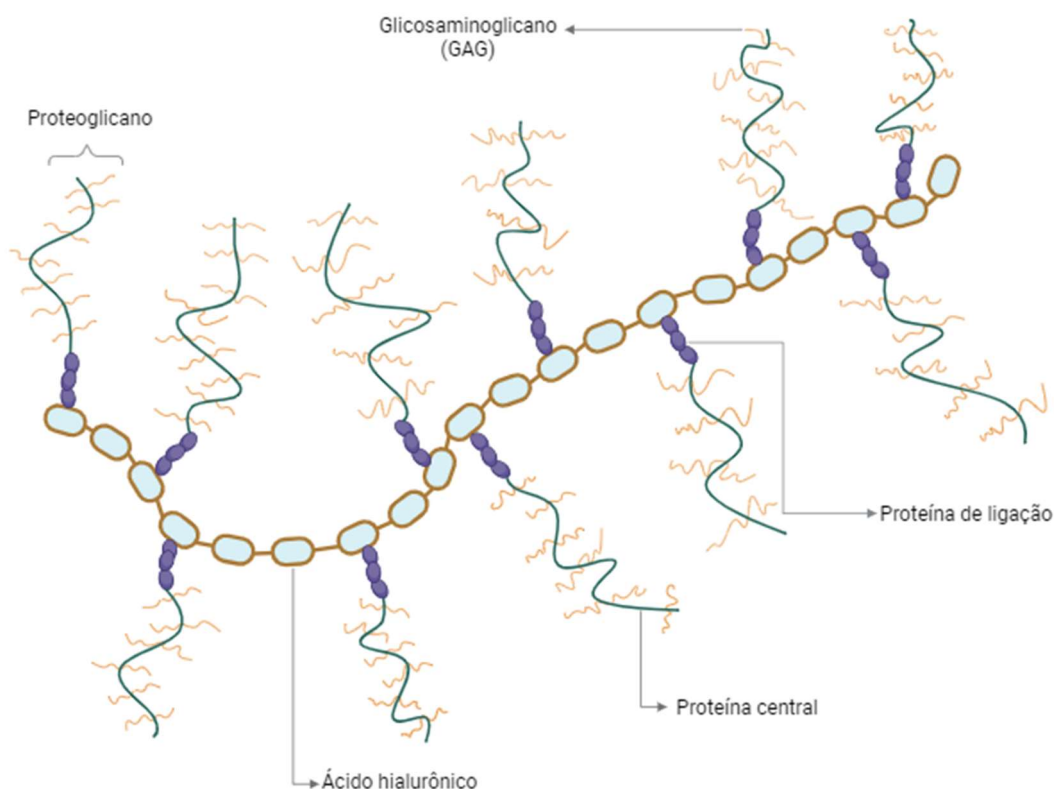


Figura 2. Estrutura geral de proteoglicanos da família dos lecticanos. Fonte: adaptado de Joshi e colaboradores, 2023.

A interação dos PGs e suas cadeias GAG associadas são essenciais para a estrutura tecidual e a homeostase tecidual e estão implicados no desenvolvimento de várias doenças. A modificação da biossíntese dos proteoglicanos e GAGs está ligada à remodelação da MEC em condições patológicas, tornando-os alvos potenciais para terapias (Timms e Maurice, 2020; Sainio e Järveläinen 2020; Yang e Wang, 2023).

2.3 Versicam

O nome versicam (VCAN) deriva de sua versatilidade como uma molécula altamente interativa, sendo também conhecido como PG-M ou CSPG2 (Proteoglicano de sulfato de condroitina 2) (Wight *et al.*, 2020). Esta molécula 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 (Islam e Watanabe, 2020). Esse proteoglicano possui domínios reconhecem e se ligam ao ácido hialurônico, enquanto também possui sítios de ligação para vários outros componentes da MEC (Timms e Maurice, 2020). Em tecidos saudáveis, os níveis de

VCAN são baixos, mas em algumas condições patológicas, como aterosclerose (Wight *et al.*, 2014), câncer de mama, próstata (Du *et al.*, 2013), leiomiossarcoma (Keire *et al.*, 2014), tumores pancreáticos (Gao *et al.*, 2020), os níveis deste proteoglicano aumentam significativamente.

O versicam é capaz de interagir com uma variedade de componentes da MEC e moléculas de superfície celular (Hirani *et al.*, 2021), incluindo ácido hialurônico, fibronectina, fibrilina e fibrinogênio, formando um conjunto de moléculas mecanicamente ativas ao redor das células (Wight *et al.*, 2017). Essas interações levam à formação de um agregado molecular que influencia as células, induzindo mudanças em sua forma, promovendo adesão, proliferação, migração e remodelação da MEC (Hirani *et al.*, 2021). O Versicam e as moléculas da MEC que se ligam a este proteoglicano têm o potencial de modular a rigidez mecânica ao redor das células, contribuindo para alterações que influenciam o comportamento e o fenótipo celular (Timms e Maurice, 2020; Roedig *et al.*, 2020).

2.3.1 Estrutura Molecular e Funções

De um ponto de vista estrutural, o VCAN é composto por três domínios distintos, que compõem seu cerne proteico, cada um com funções específicas. O domínio globular G1, também denominada região N-terminal, é responsável pela ligação ao ácido hialurônico para formar o complexo característico da família dos hialectanos (Hirani *et al.*, 2021). Na região central da molécula, encontram-se os domínios de *splicing* alternativo, cadeias tipo α - e β -glicosaminoglicanos (GAG- α e GAG- β) de sulfato de condroitina e, por fim, o domínio G3 ou região C-terminal, que contém um domínio de ligação à lectina do tipo C, dependente de cálcio, duas repetições do fator de crescimento epidérmico (EGF) e uma região de ligação à proteína do complemento (**Fig. 3**) (Hirani *et al.*, 2021; Sotoodehnejadnematalahi e Burke, 2013).

Essa molécula também é conhecida por apresentar pelo menos cinco variantes conhecidas, as isoformas V0, V1, V2, V3 (Keire *et al.*, 2014) e V4 (Kischel *et al.*, 2010) (**Fig. 3**). As isoformas do versicam resultam do *splicing* alternativo dos éxons 7 e 8, que codificam os domínios GAG- α e GAG- β , respectivamente. A isoforma V0 contém ambos os éxons, codificando os domínios GAG, sendo a maior isoforma, com até 23 cadeias de glicosaminoglicanos. A isoforma V1 contém apenas o éxon 8 e possui até 15 cadeias GAG; a isoforma V2 contém apenas o éxon 7 e tem até 8 locais de conexão

GAG, enquanto a V3 não contém nenhum éxon grande e, portanto, não possui cadeias GAG. A isoforma V4 do VCAN apresenta o domínio G1, os primeiros 398 aminoácidos da região GAG- β e o domínio G3, possuindo 5 cadeias GAG (Kischel *et al.*, 2010).

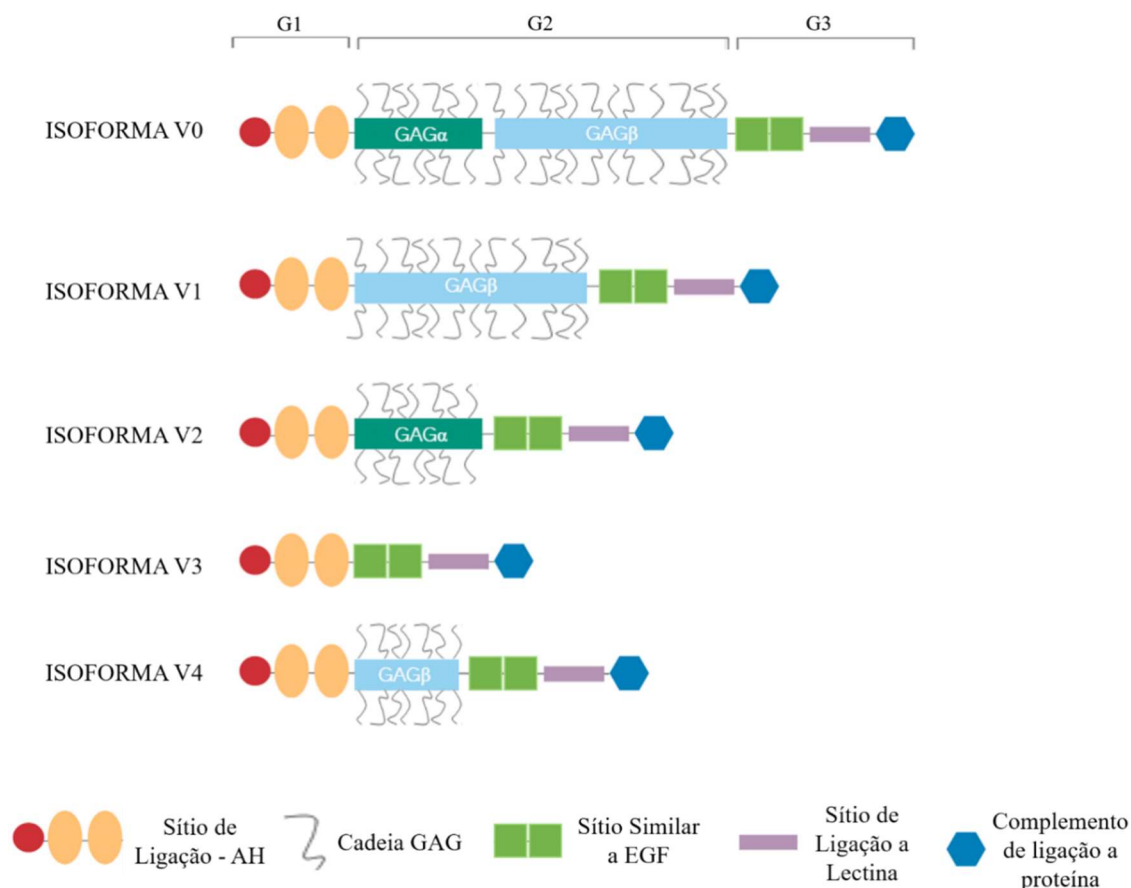


Figura 3. Isoformas de versicam. GAG – glicosaminoglicanos; EGF – fator de crescimento epidérmico. Fonte: adaptado de Nandadasa e colaboradores, 2014.

Em tecidos adultos, o VCAN é expresso, de maneira constitutiva, principalmente no sistema cardiovascular e sistema nervoso central, atuando como uma macromolécula estrutural de MEC. No entanto, VCAN também é expresso durante a embriogênese e durante a inflamação e reparo tecidual (Watanabe, 2023; Papadas *et al.*, 2020). A expressão de VCAN também está intensamente associada a diferentes tipos de neoplasias, tais como câncer de mama (Kischel *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2019), gástrico (Cheng *et al.*, 2020), de pulmão (Chang *et al.*, 2023) e de músculo liso (Keire *et al.*, 2014). Além disso, o VCAN desempenha papéis cruciais na cicatrização de feridas, angiogênese, crescimento tumoral e doenças vasculares, especialmente aterosclerose (Wight *et al.*, 2014). Os domínios G1 e G3 do versicam

estão envolvidos na regulação da proliferação, adesão e migração celular, bem como no controle do fenótipo e sinalização celular por meio de interações com integrinas e EGF-R. Os domínios de *splicing* alternativo α - e β -glicosaminoglicanos entre os domínios G1 e G3 são essenciais para a biologia do VCAN (Watanabe, 2022).

O versicam é capaz de interagir 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 β -1 (Wight *et al.*, 2020) e fornece sinais intrínsecos que podem influenciar o sistema imunológico e um fenótipo celular inflamatório (Wight *et al.*, 2014). O domínio G1, que contém uma região de ligação ao ácido hialurônico, desempenha um papel na mediação da proliferação celular, a 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 (Papadas *et al.*, 2020).

A interação do ácido hialurônico com seu receptor CD44, já foi descrita como capaz de aumentar a expressão de VCAN, implicando a via de sinalização CD44/AKT/GSK-3 β / β -catenina (Papadas *et al.*, 2020; Karagiorgou *et al.*, 2022). Além disso, o VCAN é associado à citocina pró-inflamatória IL-17A, promovendo migração e invasão celular (Wei *et al.*, 2017). As interações do VCAN com esses receptores influenciam a via de sinalização Rho-GTP/ROCK, essencial em eventos celulares como proliferação, migração e adesão (Hartman *et al.*, 2015; Johan e Samuel, 2019).

As isoformas do versicam desempenham papéis específicos em diversas condições fisiológicas e patológicas (Tabela 1). A isoforma V0, predominantemente encontrada na embriogênese, está associada ao crescimento tumoral, invasividade e metástase, além de ser encontrada no sistema nervoso e cardiovascular (Timms e Maurice, 2020; Watanabe, 2023). Assim como a V0, isoforma V1 também é relacionada com o aumento da proliferação celular, além de possuir uma ação protetiva contra a apoptose e participar da remodelação e reparo tecidual (Islam e Watanabe, 2020), enquanto a V2, presente no sistema nervoso central, inibe a proliferação celular e não está associada à resistência à apoptose (Wight *et al.*, 2020).

A isoforma V3 possui efeitos positivos para a proliferação e migração de condrócitos, células de músculo liso arterial (SMCs), fibroblastos, células de melanoma e de fibrossarcoma (Hirani *et al.*, 2021), além de ser encontrada no cérebro adulto, estômago e retina (Timms e Maurice, 2020). A expressão da isoforma V3 de

VCAN também é associada a remodelação de MEC, particularmente na síntese de tropoelastina, na montagem de fibras elásticas e na redução do acúmulo de ácido hialurônico, promovendo um efeito anti-inflamatório em tecidos vasculares (Harten *et al.*, 2020; Hirani *et al.*, 2021). Adicionalmente, a isoforma V3 pode desempenhar uma função dupla, inibindo o crescimento do tumor primário, mas estimulando a metástase (Serra *et al.*, 2005; Miquel-Serra *et al.*, 2006).

Estudos mais recentes apontam a isoforma V3 como uma potencial molécula contrastante, em comparação com as demais isoformas de VCAN, no entanto ainda é considerado um desafio compreender como esta isoforma atua na regulação da MEC no desenvolvimento e na doença (Wight *et al.*, 2023). Pouco se sabe sobre a V4, regulada positivamente em lesões de câncer de mama humano, porém, seu papel específico na progressão do câncer de mama ainda demanda mais investigações (Kischel *et al.*, 2010). Bogen e colaboradores (2019), recentemente descreveram uma nova variante de VCAN, a isoforma V5, composta apenas pelo domínio N-terminal da região de ligação ao ácido hialurônico e a região C-terminal da cadeia GAG- β . A expressão desta nova variante foi encontrada em neurônios sensoriais lesionados de ratos e é proposta por desempenhar um potencial fator de sobrevivência para estas células.

Isoforma	Loca de expressão	Função
V0	Tecidos embrionários, sistemas nervoso, cardiovascular, respiratório e placenta	Aumento de crescimento tumoral, invasividade e metástase.
V1	Tecidos embrionários, sistema respiratório, células de músculo esquelético e placenta	Aumento de crescimento tumoral, invasividade, metástase, proliferação, proteção contra apoptose, remodelação e reparo tecidual
V2	Sistema nervoso central adulto	Inibição de proliferação, diferenciação e migração de células do sistema nervoso

V3	SMCs, fibroblastos, células de melanoma e de fibrossarcoma cérebro adulto, estômago e retina	Aumento de proliferação, migração e remodelação de MEC
V4	Lesões de câncer de mama humano	Papel específico na progressão do câncer de mama humano ainda não relatado na literatura
V5	Neurônios sensoriais lesionados de ratos	Potencial papel na sobrevivência de neurônios de ratos

Tabela 1. Localização e principais funções da isoformas de versicam.

A proteólise de VCAN pode ocorrer pela ação de proteinases ADAMTS ou MMPs, em diferentes regiões da molécula. As MMPs-1, -2, -3, -7 e -9 e as enzimas ADAMTS dos subtipos -1, -4, -5, -9, -15 e -20, são associadas à clivagem de VCAN, resultando no fragmento bioativo mais conhecido deste PG, denominado *versikine* (Timms e Maurice, 2020; Islam *et al.*, 2022). O *versikine* é gerado a partir da proteólise das isoformas V0 e V1 de VCAN, na região do domínio GAG- β , resultando no fragmento G1-DPEAAE⁴⁴¹, de ~80kDa (**Fig. 4**), que, reconhecidamente, desempenha papéis biologicamente significativos na migração e invasão celular, promoção de aspectos relacionados à TEM, recrutamento, sobrevivência e ativação de células dendríticas, além de atuar em diferentes contextos relacionados a progressão tumoral (Papadas *et al.*, 2021; Deb *et al.*, 2022; Timms e Maurice, 2020).

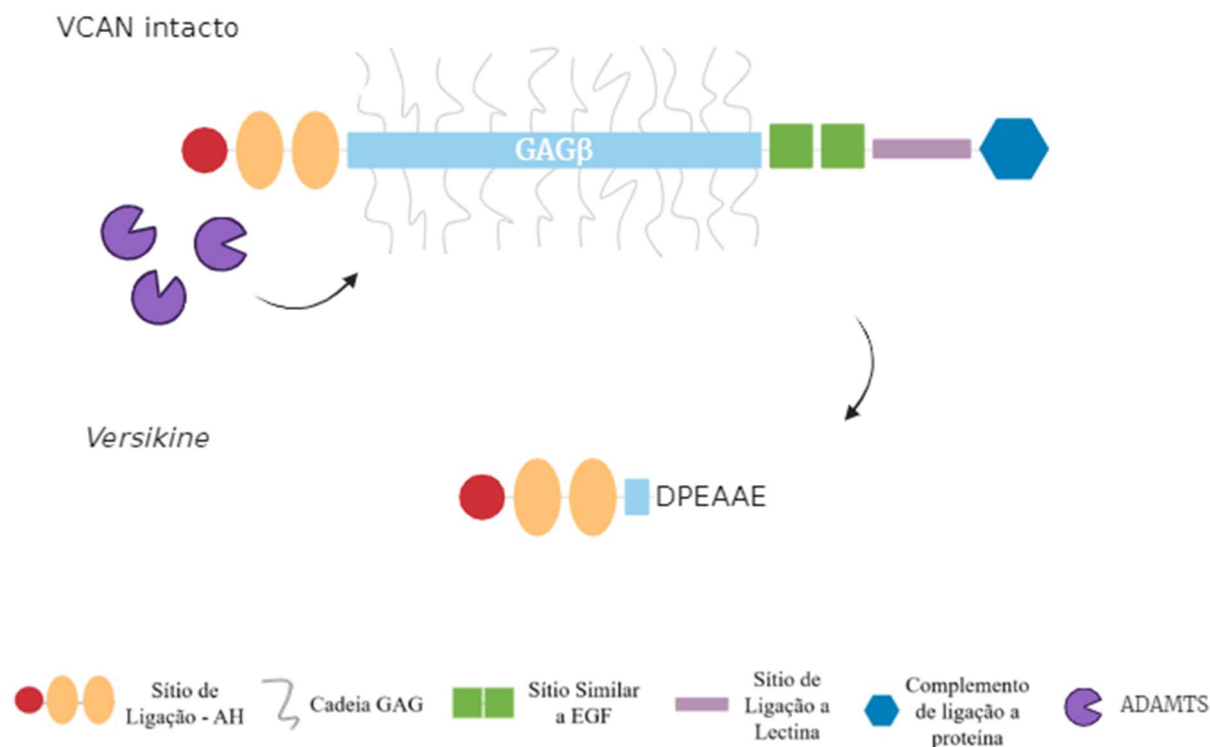


Figura 4. Representação da estrutura de versikine. GAG - glicosaminoglicanos; EGF – fator de crescimento epidérmico; ADAMTS - metaloproteinase com motivos de trombospondina. Fonte: adaptado de Papadas e colaboradores, 2020.

2.3.2 Versicam e Motilidade Celular

O versicam desempenha um papel importante em contextos cancerígenos, sendo sua principal característica, favorecer um microambiente favorável à migração, invasão e metástase (Islam *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2021). Este proteoglicano reduz a adesão e promove a migração e invasão de células neoplásicas, contribuindo para o aumento do fenótipo agressivo de tumores (Islam e Watanabe, 2020). As isoformas V0 e V1 são descritas como reguladoras do processo de migração celular, sendo encontradas com mais frequência em neoplasias (Islam e Watanabe, 2020; Papadas *et al.*, 2020).

No sistema nervoso central, a isoforma V2 inibe o crescimento axonal e a migração (Wight *et al.*, 2014), e também já foi associada à redução da expressão de Snail e o aumento dos níveis de E-caderina, por meio da inibição do eixo EGFR/ERK/GSK3β, enquanto a isoforma V1 está associada ao aumento da ativação

da via de EGFR (Karagiorgou *et al.*, 2022). A isoforma V3 de VCAN interfere com vias específicas de regulação da proliferação e migração celular, via sinalização via CD44-EGFR / ErbB2, tornando possível a diminuição da proliferação e o aumento da adesão em células tumorais de melanoma, invertendo o fenótipo promovido pelas isoformas V0 e V1 (Serra *et al.*, 2005), a isoforma V3 também possui um papel promotor de proliferação e migração em condrócitos, células de músculo liso arterial, fibroblastos, células de mieloma e fibrossarcoma (Harten *et al.*, 2020). Em células-tronco de câncer de próstata CD133⁺/CD44⁺, o VCAN causa a supressão da adesão das células neoplásicas à fibronectina e, assim, aumenta a motilidade celular (Oktem *et al.*, 2014). Além disso, o versican influencia a migração de células do sistema imunológico, sendo importante para respostas inflamatórias e, sendo capaz de influenciar a formação de estruturas de MEC em resposta a citocinas inflamatórias, promovendo a adesão de leucócitos, possuindo, também um relevante papel imunomodulador (Wight *et al.*, 2020).

2.4 Transição Epitélio-Mesenquimal (TEM)

A transição epitélio-mesenquimal (TEM) é um processo de transdiferenciação em que as células epiteliais adquirem características típicas das células mesenquimais. Neste processo, células epiteliais perdem características típicas, como junções e polaridade basoapical, enquanto adquirem uma maior capacidade de migrar e invadir os tecidos circundantes (Manfioletti e Fedele, 2022). Este fenômeno é altamente dinâmico e sofre influência de diferentes vias de sinalização, que atuam na mudança do fenótipo celular (Debnath *et al.*, 2022).

A TEM desempenha um papel fundamental durante o desenvolvimento embrionário, tornando possíveis movimentações celulares essenciais para a formação de uma variedade de tecidos, o desenvolvimento da crista neural é um exemplo de processo que depende da TEM (Bracken e Goodall, 2022). Além do seu papel em um contexto fisiológico, a TEM também atua significativamente em diversas condições patológicas, como fibrose e a progressão metastática de neoplasias. Em razão à sua importância em contextos biológicos e patológicos, a TEM tem sido extensivamente investigada, levando à identificação de diversos reguladores e genes envolvidos nesse processo complexo (Acloque *et al.*, 2009; Bracken e Goodall, 2022; Nieto *et al.*, 2009).

2.4.1 Classificação da TEM

A TEM ocorre em três cenários biológicos distintos, cada um com efeitos funcionais diferentes, e, embora os sinais específicos que a desencadeiam este fenômeno celular não sejam completamente compreendidos, é amplamente reconhecido que existem diferenças significativas em como essas transformações funcionam (Marconi *et al.*, 2021). Um resumo sobre os tipos de TEM e suas principais características está contido na tabela 2.

A TEM do tipo 1 está associada à implantação, embriogênese e desenvolvimento de órgãos e é organizada para gerar diversos tipos celulares que compartilham fenótipos mesenquimais comuns (Lim e Thiery, 2012; Kim *et al.*, 2009). Na placenta, células citotrofoblásticas passam por um processo de TEM, se diferenciando em células do citotrofoblasto extraviloso (EVT), com a finalidade de facilitar a invasão e ancoragem ao endométrio (Ilsley *et al.*, 2020).

A TEM do tipo 2 está associada à manutenção da homeostase, cicatrização de feridas, reparação tecidual e fibrose, geralmente resultado de eventos como traumas e lesões inflamatórias (Kalluri e Weinberg, 2009; Marconi *et al.*, 2021). Estudos com camundongos transgênicos demonstraram que, por meio da expressão controlada de genes repórteres germinativos, células epiteliais são capazes de se diferenciar em fibroblastos, por meio de TEM, durante o processo de fibrose tecidual em diferentes órgãos (Potenta *et al.*, 2008).

Durante a fase de remodelação tecidual, da cicatrização de feridas, a participação de miofibroblastos promove mudanças teciduais, sugerindo uma mudança fenotípica decorrente de TEM, pela qual estes miofibroblastos são capazes de renovar a estrutura tecidual danificada (Marconi *et al.*, 2021). Em outros processos patológicos semelhantes ao desenvolvimento normal, células endoteliais associadas à microvasculatura também podem passar por uma transição análoga, um fenômeno chamado Transição Endotelial Mesenquimal (EndMT). Mais especificamente, durante a embriogênese, a EndMT contribui para a formação de fibroblastos no coração. Em casos de fibrose causada por lesão cardíaca pós isquemia, a EndMT que ocorre no endocárdio e no endotélio microvascular desempenha um papel fundamental na geração de novos fibroblastos (Zeisberg *et al.*, 2007). E, embora ainda não completamente elucidado, é possível que muitos reguladores moleculares de TEM também possam atuar durante a EndMT (Kalluri e Weinberg, 2009).

A TEM do tipo 3 ocorre em células neoplásicas que passaram por alterações genéticas e epigenéticas, especialmente em genes que promovem o crescimento clonal e o desenvolvimento de tumores locais. No entanto, estas células podem se diferenciar por TEM em diferentes níveis, algumas retendo muitas características epiteliais enquanto adquirem algumas características mesenquimais, enquanto outras perdem completamente suas origens epiteliais e se tornam totalmente mesenquimais (Kalluri e Weinberg, 2009; Marconi *et al.*, 2021).

A proliferação excessiva de células epiteliais e a angiogênese são características essenciais, tanto durante a embriogênese, quanto no crescimento inicial e desenvolvimento de tumores primários (Goulioumis e Gyftopoulos, 2022). O alto potencial de invasão destas células, extensamente investigado, sinaliza as etapas finais do processo que leva à disseminação metastática, dependente da TEM, tal fenômeno tem sido identificado como um mecanismo crucial na aquisição de características malignas pelas células epiteliais cancerígenas (Wang e Mi, 2023).

Além disso, diferentes mecanismos celulares impulsionados pela TEM são capazes de modular um estado de imunossupressão para escapar da vigilância imunológica e remodelam a MEC para completar a progressão para a metástase (Ho e Msallam, 2021). Uma TEM é capaz de mediar a metástase tumoral por meio de uma série de eventos celulares e moleculares, em vez de um único evento. Estudos sugerem que uma assinatura de TEM em células tumorais de câncer pode originar células tumorais cancerígenas iniciadoras de recidivas (Kim *et al.*, 2017).

Resumidamente, células neoplásicas ativadas por TEM, se tornam capazes de migrar do tumor primário e realizar o intravasamento nos vasos sanguíneos, translocação pela circulação, extravasamento no parênquima de tecidos distantes e sobreviver como depósitos micrometastáticos (Zhang e Weinberg, 2018; Lambert *et al.*, 2017). Posteriormente, após processo metastático, essas células de carcinoma se agrupam e formam colônias secundárias, que, histologicamente se assemelham ao tumor primário, sem exibir o fenótipo mesenquimal adquirido anteriormente para realização processo migratório e invasivo, caracterizando a TME (Zeisberg *et al.*, 2005). Embora o completo cenário de agentes de sinalização contribuintes para TEM das células neoplásicas ainda não esteja totalmente compreendido, sugere-se que alterações genéticas e epigenéticas nas células cancerígenas as tornam altamente responsivas a sinais indutores de TEM provenientes do estroma tumoral associado.

Tipo de TEM	Funções	Principais características	Desfecho
Tipo I	Implantação, embriogênese e desenvolvimento dos órgãos	Estabelece diversos tipos celulares que podem passar por MET para formar células epiteliais secundárias durante a embriogênese.	Não gera fibrose e não induz invasão.
Tipo II	Cicatrização de feridas, regeneração tecidual e fibrose	Gera fibroblastos e outras células relacionadas para reconstruir tecidos após trauma e lesão inflamatória.	Induz fibrose, mas não promove invasão.
Tipo III	Transformação maligna de células cancerígenas	Produce células cancerígenas que mantêm muitas características epiteliais junto com algumas características mesenquimais, ou produz células cancerígenas que se tornam totalmente mesenquimais.	Promove invasão e metástase.

Tabela 2. Tipos de TEM e suas principais características. Fonte: adaptado de Kim *et al.*, 2017.

2.4.2 Marcadores e mecanismos moleculares da TEM

Células submetidas à TEM deixam de expressar marcadores proteínas relacionadas ao fenótipo epitelial, assim como reorganizam seu programa de expressão gênica para promover alterações no seu citoesqueleto, facilitar a adesão a outras células mesenquimais e modificar a interação das células com a matriz extracelular (Lamouille *et al.*, 2014; Marconi *et al.*, 2021). Variações nos perfis de expressão gênica associados à TEM são evidentes e dependem do tipo celular e tecidual, bem como do grau de progressão em direção à diferenciação mesenquimal (Lamouille *et al.*, 2014).

Uma característica marcante da TEM é a regulação negativa da expressão de caderina epitelial (E-caderina), desestabilizando as junções aderentes e à perda da função de barreira epitelial (Lamouille *et al.*, 2014). Adicionalmente, ocorre uma inibição da expressão de genes que codificam claudinas, ocludina, desmoplaquina e placofilina, resultando na dissolução das junções apicais e desmossomas,

respectivamente (Huang *et al.*, 2012). Mais especificamente, a redução da E-caderina é associada ao aumento da expressão da caderina neural (N-caderina mesenquimal), resultando em uma "troca de caderinas" que altera a adesão celular (Kim *et al.*, 2017) e facilita a migração e invasão celular (Noronha *et al.*, 2021).

A N-caderina interage com o citoesqueleto por intermédio da α -catenina, β -catenina, p120-catenina, receptores tirosina quinase (RTKs), e receptores de fator de crescimento de fibroblastos (FGFRs) (WEHRENDT *et al.*, 2016). O processo de TEM também ativa a expressão da molécula de adesão celular neural (NCAM), que interage com a N-caderina para modular a atividade de RTKs associados a esta molécula para facilitar a montagem de adesões focais, migração e invasão (Lehembre *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2016).

Outros fatores essenciais para o desencadeamento e a progressão da TEM são a remodelação da MEC e as alterações das interações celulares. Integrinas formam complexos que permitem às células receber sinais da matriz extracelular através de mediadores como quinase ligada à integrina (ILK), LIMS1 e parvina (Ellert-Miklaszewska *et al.*, 2020; Rooney *et al.*, 2016). Durante a TEM, células epiteliais reduzem a expressão de algumas integrinas e ativam outras, alterando como se comunicam com a MEC circunvizinha. Por exemplo, a TEM diminui a expressão das integrinas $\alpha 6 \beta 4$ que regulam contatos com a membrana basal (Karagiorgou *et al.*, 2022).

Ainda, a integrina $\alpha 3 \beta 1$, que se liga à laminina e à E-caderina, também é importante para a progressão da TEM, integrando as sinalizações de β -catenina e do fator de crescimento transformador- β (TGF β) /SMAD (Dhaliwal e Shepherd, 2022; Kim *et al.*, 2009). Adicionalmente, o aumento da expressão da integrina $\alpha 5 \beta 1$ durante a TEM promove adesão celular à fibronectina, que, conjuntamente, tem sua expressão ativada, estimulando a migração celular (Mise *et al.*, 2012; Dhaliwal e Shepherd, 2022). O aumento da expressão de integrinas $\alpha 1 \beta 1$ e $\alpha 2 \beta 1$, e sua interatividade com colágeno do tipo 1 na MEC promove a dissociação dos complexos de E-caderina e a translocação nuclear de β -catenina, assim como a indução da expressão de N-caderina (Lamouille *et al.*, 2014; Elango *et al.*, 2022). Tais mudanças na expressão de integrinas repercutem no aumento da expressão de MMP-2 e MMP-9, proporcionando o aumento da degradação das moléculas de MEC e facilitando o processo de invasão das células submetidas a TEM (Nistico *et al.*, 2012; Niland *et al.*, 2021).

O processo de degradação e remodelamento da MEC por células invasivas, na TEM pode liberar diferentes fatores de crescimento que, por sua vez, podem atuar de forma autócrina. A integrina $\alpha\beta6$ ativa o TGF β , disponível na MEC, promovendo a TEM e estimulando a expressão de colágenos e fibronectina, remodelando a MEC e alterando algumas de suas propriedades (Lamouille *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2020).

Os principais fatores de transcrição que regulam a TEM, em diferentes contextos são: SNAIL, TWIST e zinc-finger E-box-binding (ZEB). Estas moléculas reguladoras tem diferentes perfis de expressão, e, a depender do tipo celular ou de tecido em que elas atuam, podem variar seu desempenho. Estes fatores de transcrição são capazes de regular mutuamente sua expressão, além de direcionar e impulsionar a progressão da TEM, geralmente influenciando na supressão de genes epiteliais e ativando os que conferem características mesenquimais (Lamouille *et al.*, 2014; Marconi *et al.*, 2021; Karariorgou *et al.*, 2022).

Durante a TEM que ocorre na gastrulação (TEM do tipo 1), existe uma coordenação mediada pela sinalização Wnt (Hernández-Martínez *et al.*, 2019; Coelho *et al.*, 2020). Da mesma forma, também há interferência de Nodal e Vg1, proteínas da superfamília TGF- β , e receptores de FGF para regulação da gastrulação (Hernández-Martínez *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2017). Outros fatores de transcrição que coordenam a TEM associada à gastrulação são Snail, Eomes e Mesps. Nesse sentido, Snail é capaz de conter a expressão de E-caderina e induz a EMT mediada por moléculas relacionadas à adesão celular, tais como ocludinas e claudinas, regulando a expressão de genes de polaridade, como Discs large (Dlg) e Crumbs homolog 3 (Crb3) (Marconi *et al.*, 2021).

No contexto da TEM associada à fibrose tecidual, os marcadores mais frequentemente associados são a proteína específica de fibroblastos 1 (FSP1), α -SMA e colágeno I (Kim *et al.*, 2017; Marconi *et al.*, 2021). Em conjunto com o receptor tirosina quinase 2 do domínio discoidino (DDR2), vimentina e desmina, essas moléculas tem sido correlacionadas à inflamação crônica em células epiteliais de rim, fígado, pulmão e intestino humanos, que, provavelmente apresentam um estado intermediário de TEM (ou TEM “parcial”, pois expressão, juntamente com esses marcadores mesenquimais, marcadores epiteliais tais como citoqueratina e E-caderina (Hashem, 2019).

Diferentes estudos relataram perfis de expressão gênica diferenciados entre modelos de cicatrizes hiperplásicas e de pele normal. A expressão diferencial de miRNAs em cicatrizes pode já foi correlacionada com a expressão de TGF- β (Babalola *et al.*, 2013; Marconi *et al.*, 2021). Ademais, a regulação do eixo de sinalização autócrina TGF- β /ZEB/miR-200 é capaz de controlar a plasticidade entre os fenótipos epiteliais e mesenquimais das células; tal controle é feito por meio da repressão da tradução de proteínas reguladoras específicas, como a E-caderina, e repressores transcricionais, como ZEB1 e ZEB2 (Yin *et al.*, 2013). A fibrose coordenada por TEM depende da ação de diversas citocinas e fatores de crescimento, principalmente VEGF e TGF- β 1, muito associado à capacidade migratória das células (Marconi *et al.*, 2021; Debnath *et al.*, 2022).

A TEM do tipo 3 é comumente associada a diferentes moléculas sinalizadoras, tais como Wnt, TGF β , BMP, FGF, EGF, HGF, PDGF, VEGF, estrogênio e SCF; quem em conjunto, estimulam várias vias de sinalização, que regulam a TEM. Adicionalmente, SNAIL, SLUG, ZEB1, ZEB2, assim como TWIST1 e TWIST2 são fatores influenciados pela ação destas moléculas sinalizadoras. A regulação da expressão destes fatores de transcrição atua na supressão da expressão de marcadores epiteliais como E-caderina, claudina, ocludina, mucina-1, PTEN, e RKIP, bem como são capazes de ativar marcadores mesenquimais como N-caderina, vimentina, vitronectina e MMPs (Debnath *et al.*, 2022).

A efetivação do processo de TEM, no contexto do microambiente tumoral, depende de complexas redes de sinalização intracelular, envolvendo diferentes vias de sinalização, tais como ERK, MAPK, PI3K, Akt, Smads, RhoB, β -catenina, lymphoid enhancer binding factor (LEF), Ras e c-Fos, assim como proteínas de superfície celular, incluindo β 4 integrinas, α 5 β 1 integrina e α V β 6 integrina (Kalluri e Weinberg, 2009; Jamal Eddin *et al.*, 2023).

Durante a tumorigênese primária, o TGF- β , que é um importante supressor da proliferação de células epiteliais, é capaz de agir como um regulador positivo da progressão tumoral e metástase (Wang *et al.*, 2023); tendo sido demonstrado em estudos *in vitro*, como sendo um indutor da TEM em células neoplásicas (Weng *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2020). Vias de sinalização envolvendo proteínas Smad (facilitadoras da motilidade celular) também já foram descritas como mediadoras da TEM induzida pelo TGF- β , atuando via receptor ALK-5 (Witte *et al.*, 2017). Vias de sinalização

envolvendo β -catenina e LEF também cooperam com Smads na indução da TEM (Lamouille *et al.*, 2014).

A correlação entre a supressão da expressão de E-caderina por células neoplásicas e a progressão tumoral associada à TEM é comumente citada na literatura (Wong *et al.*, 2018; Na *et al.*, 2020). Além disso, durante a TEM, há uma reorganização dos complexos de adesão das células epiteliais, e a proliferação celular é suprimida quando a porção completa ou citoplasmática de E-caderina (que contém o sítio de ligação β -catenina) é expressa ectopicamente em células que passaram por TEM, revertendo seu fenótipo mesenquimal (Shankar e Nabi, 2015; Sommariva e Gagliano, 2020). A retenção de β -catenina no citoplasma é essencial para preservar as características epiteliais das células neoplásicas; ainda o movimento de β -catenina para o núcleo, onde se integra aos complexos TCF/LEF, está correlacionado com a perda da expressão de E-caderina e a suscetibilidade à TEM e à aquisição de um fenótipo invasivo (Shang *et al.*, 2017; Kyuno *et al.*, 2021).

Outros fatores que possuem importante contribuição na sinalização da TEM são os microRNAs não codificantes, sendo alguns capazes de controlar a expressão dos principais fatores de transcrição que modulam da TEM (Lamouille *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2021). Por exemplo, membros da família miR-200 e miR-205 reprimem a tradução dos mRNAs que codificam ZEB1 e ZEB2, e exercem um controle de feedback duplo-negativo regula a expressão de ZEB e miR-200, com as proteínas ZEB reprimindo a expressão dos miRNAs miR-200, enquanto miR-200 suprime a expressão de ZEB (Górecki e Rak, 2021). Em células de câncer de mama, a expressão de miR204, miR-200c e miR-34a inibiram a capacidade de auto renovação e metástase, suprimindo a TEM (Pan *et al.*, 2021; Rahimi *et al.*, 2019). Além disso, miR-155 reduz a dispersão de células de câncer de gástrico *in vitro*, inibindo RHOA (Wang *et al.*, 2018), enquanto miR-124 diminui a TEM, invasão celular e metástase, atingindo ROCK2, um efetor da via de sinalização RHOA (Zheng *et al.*, 2012). Estas atividades regulatórias dos miRNAs constituem uma complexa rede de regulação que as células usam para controlar a TEM. Um resumo de fatores envolvidos nos mecanismos moleculares da TEM está presente na figura 5.

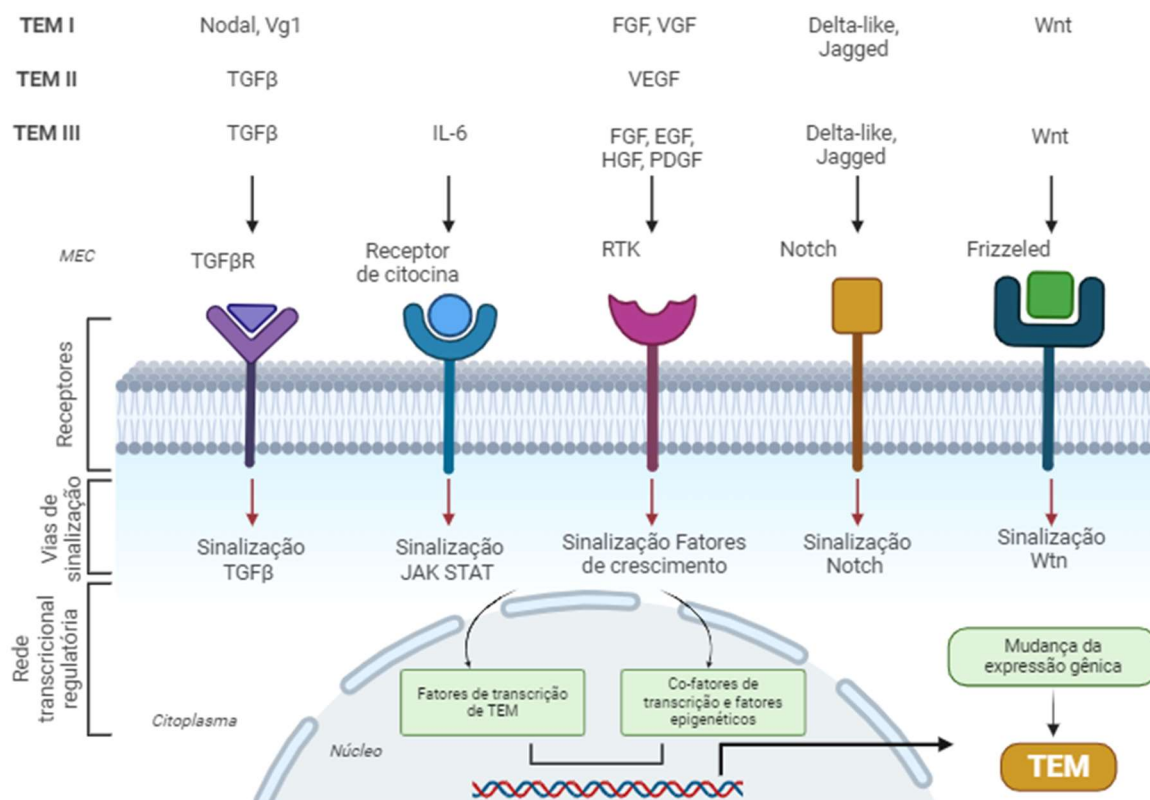


Figura 5. Mecanismos gerais que coordenam a TEM. Vg1 - glicosaminoglicanos; FGF – fator de crescimento de fibroblastos; VGF – fator de crescimento nervoso; VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular; HGF – fator de crescimento de hepatócitos; PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas; EGF – fator de crescimento epidérmico; TGFβR – Receptor de TGFβ; RTK – Receptor de tirosina quinase. Fonte: adaptado de Debnath e colaboradores, 2022.

2.4.3 Transição epitélio-mesenquimal na gestação

O desenvolvimento adequado da placenta durante a gestação, depende de uma variedade de fatores. Um fator de destaque é a diferenciação das células trofoblásticas em sinciotrofoblasto e células do trofoblasto extraviloso (EVT) (Da Silva-Arnold *et al.*, 2019).

Para o processo de diferenciação das EVT, as células do citotrofoblasto viloso (CTB) localizadas nas colunas celulares de ancoragem da placenta passam por uma mudança de fenótipo e passam por um processo de trans-diferenciação, originando células EVT, que invadem a decídua uterina e são capazes de remodelar as arteríolas espirais maternas para que se tornem vasos com diâmetro aumentada, menor

resistência e alta condutância, capazes de suportar um fluxo sanguíneo de alto volume (Da Silva-Arnold *et al.*, 2019; Choudhury *et al.*, 2022; Lawless *et al.* 2023). Este processo de diferenciação e invasão envolve a TEM, já que células CTB que se diferenciam em EVT, apresentam um fenótipo mesenquimal metastático durante o primeiro trimestre de gestação, e no terceiro trimestre esse fenótipo é atenuado; assim, essa modulação do fenótipo das células trofoblásticas invasivas está correlacionado como componente-chave de várias patologias placentárias importantes. Estas incluem a subinvasão trofoblástica, que pode resultar em pré-eclâmpsia ou restrição de crescimento intrauterino, bem como o oposto, a superinvasão, que pode resultar em patologias relacionadas à placenta anormalmente invasiva (PAI) (Tantbirojn *et al.*, 2008; Ilesley *et al.*, 2020).

A literatura demonstra que a diferenciação das células do citotrofoblasto em EVT envolve uma TEM muito semelhante ao que acontece durante a embriogênese, cicatrização de feridas e metástase (Da Silva-Arnold *et al.*, 2015, 2018). Apesar de algumas semelhanças, a diferenciação das células trofoblásticas citotrofoblásticas (CTB) em células do trofoblasto extraviloso (EVT) apresenta determinadas diferenças, quando comparada aos três tipos de TEM descritos na literatura (Kalluri e Weinberg, 2009; Marconi *et al.*, 2021). Diferentemente do que acontece durante a embriogênese (TEM do tipo 1), a diferenciação do CTB não resulta na formação do mesênquima de um novo tecido. Ademais, não promove a mobilidade e a flexibilidade necessárias para regenerar células epiteliais, ao contrário do processo de metástase do câncer (TEM do tipo 2). Entretanto, semelhante ao que ocorre em carcinomas, as EVT diferenciadas a partir de CTB, demonstram certa plasticidade, sendo capazes de apresentar, simultaneamente, características epiteliais enquanto adquirem características mesenquimais (Da Silva-Arnold *et al.*, 2015, 2018). Especificamente, a TEM que ocorre durante a placentação é progressiva, principalmente durante o primeiro trimestre de gestação e sofre uma redução no terceiro trimestre da gestação, levando a EVT em um estado metastável, menos mesenquimal em comparação com as células EVT atuantes no primeiro trimestre. Por outro lado, evidências também indicam que, quando há uma disfunção no poder invasivo das EVT, como em casos de PAS, essas células demonstram um estado de TEM mais mesenquimal em comparação com as EVT normais do terceiro trimestre (Da Silva-Arnold *et al.*, 2018).

A diferenciação de CTB em EVT envolve diferentes fatores de transcrição e vias de sinalização reguladoras. Fatores como GSC, SNAI1, SNAI2, TWIST1, ZEB1 e ZEB2 foram descritos como capazes de influenciar este fenômeno celular (Comijn *et al.*, 2001). Mais especificamente, ZEB2 desempenha um papel essencial no processo de invasão do EVT, sendo expresso cerca de 200 vezes mais no EVT invasivo de primeiro trimestre em comparação com o CTB (Da Silva-Arnold *et al.*, 2015). Por outro lado, no terceiro trimestre, os níveis de ZEB2 são reduzidos, coincidindo com o decréscimo da capacidade invasiva dessas células (Da Silva-Arnold *et al.*, 2018).

Zhang e colaboradores (2019) descreveram a via de sinalização que envolve PAPSS2 e VCAN, que tem sua expressão estimulada por Snail, e, nas linhagens celulares de câncer de mama MCF7 e MDA-MB-231, desempenharam um papel fundamental no aumento da migração celular e metástase. Demonstrando, assim, que a expressão de Snail, PAPSS2 e VCAN está positivamente correlacionada em tecidos de câncer de mama, e que estas vias de sinalização podem ser fundamentais para entender os programas genéticos que controlam a metástase tumoral e podem identificar alvos terapêuticos previamente não detectados para tratar doenças metastáticas (Zhang *et al.*, 2018).

2.4.4 Versicam e a TEM

O VCAN é considerado um mediador extracelular da TEM, por seu efeito no fenótipo e funções celulares, um exemplo desse papel é a importância da expressão deste PG em conjunto com ácido hialurônico durante a embriogênese, mais especificamente na diferenciação de células-tronco embrionárias (ESCs) pluripotentes (Karagiorgou *et al.*, 2022). Além disso, o VCAN é intensamente expresso por células-tronco cancerígenas (Nallanthighal *et al.*, 2019); e a supressão da expressão deste PG já foi associada ao bloqueio de auto-renovação em células de câncer de mama, e a superexpressão do domínio G3 de VCAN está correlacionado à promoção da auto-renovação de células neoplásicas por meio da ativação da via de sinalização EGFR/AKT/GSK3 β (Du *et al.*, 2013a). A expressão de VCAN é positivamente regulada por Snail, um fator de transcrição associado à TEM. Além do VCAN, o Snail induz a transcrição de PAPSS2, levando a níveis elevados de sulfatação do VCAN, o que, por sua vez, está associado ao aumento de migração e metástase em células de câncer de mama humano (Zhang *et al.*, 2019).

Em células de câncer de bexiga, o eixo FAP/VCAN, assim como a expressão de VCAN conjuntamente com a via de sinalização PI3K/AKT, foi correlacionado com a TEM regulada por TGF- β 1, secretado por fibroblastos estromais ou fibroblastos associados ao câncer (CAFs), afetando, dessa maneira a invasão e metástase no microambiente tumoral. Tais resultados, podem classificar a expressão diferencial de VCAN como um potencial biomarcador para o diagnóstico de câncer de bexiga (Ping *et al.*, 2023). Ainda, a expressão de VCAN por células estromais no microambiente tumoral afeta o comportamento de células de carcinoma de mama, em modelo murino. A expressão de VCAN, influenciada por TGF- β 1 em CAFs, aumenta o acúmulo de macrófagos associados ao câncer e intensifica a progressão tumoral por acentuar características mais agressivas em células cancerígenas, fenótipo correlacionado com células em processo de TEM (Dos Reis *et al.*, 2019).

O VCAN também está envolvido na transição mesenquimal-epitelial (TME), um fenômeno reverso à TEM, nesse sentido, a expressão de VCAN derivado de células progenitoras mieloides da medula óssea, em modelo de câncer de mama metastático humano, foi capaz de induzir a TME em células tumorais em situação pré-metastática através da inibição da via TGF β /SMAD2/3 (Gao *et al.*, 2012; Karagiorgou *et al.*, 2022). Assim, o VCAN, por sua capacidade de regular tanto a TEM quanto a TME, pode, potencialmente ser reconhecido como uma molécula crucial no controle da plasticidade celular durante o desenvolvimento e na malignidade de neoplasias (Du *et al.*, 2013b).

Os produtos da proteólise de VCAN, mais especificamente os resíduos da região G1, estão associados ao remodelamento da MEC, promovendo um fenótipo compatível com o perfil de transição epitélio-mesenquimal, resultando em uma maior migração celular (Timms e Maurice, 2020). Em células cardíacas do miocárdio, a expressão íntegra ou dos fragmentos de VCAN, mais especificamente o fragmento bioativo G1-DPEAAE (*versikine*), causou afinamento do miocárdio *in vivo*, arredondamento celular e perda de adesão célula-célula *in vitro* (Kern *et al.*, 2007). Características semelhantes à TEM vistas em células miocárdicas transfectadas com o domínio G1 de VCAN foram associadas à distribuição de G1-DPEAAE, assim, a associação G1-DPEAAE com células cardíacas, passando por TEM e o efeito antiadesivo de G1 *in vitro* sugerem fortemente um papel para *versikine* na TEM, promovendo um fenótipo de maior mobilidade celular (Kern *et al.*, 2006; 2007).

Embora os mecanismos moleculares que controlam a TEM em células trofoblásticas ainda estejam pouco elucidados, sabe-se que o EGF atua como um indutor das vias sinalização relacionadas à TEM (Kim *et al.*, 2016); adicionalmente, a expressão do fator de transcrição ZEB2 também é considerada essencial durante a diferenciação de células trofoblásticas, facilitando a TEM e aumentando a invasividade dessas células (Da Silva-Arnold *et al.*, 2018).

3 OBJETIVOS

Geral

Avaliar a influência que o versicam exerce sobre a transição epitélio-mesenquimal e a motilidade de células trofoblásticas *in vitro*.

Específicos

Utilizar células HTR-8/SVneo, que são altamente invasivas e positivas para versicam, assemelhando-se a um perfil de PAS, para:

- Confirmar a secreção de versicam no sobrenadante e manipular essa secreção por meio do silenciamento gênico;
- Avaliar se o silenciamento gênico de versicam afeta a motilidade das células, elasticidade celular e a expressão de marcadores de TEM.

4 METODOLOGIA

4.1 Cultura de células

Os experimentos foram realizados com as células HTR-8/SVneo, uma linhagem de células trofoblásticas de primeiro trimestre de gestação. Também foi utilizada a linhagem de células endoteliais EA.hy-926. As células foram mantidas em estufa à 37 °C com 5% de dióxido de carbono circulante, em garrafas próprias para cultivo celular. E mantidas em meio DMEM/F12 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) suplementado, com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Sigma) e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina, gentamicina) e anfotericina B (Sigma). Todos os experimentos foram realizados até a vigésima passagem, sendo cada passagem realizada após as células alcançarem de 60 a 70% de confluência em cultivo no caso da HTR-8/SVneo, enquanto as células EA.hy-926 foram subcultivadas após 90% de confluência.

4.2 Silenciamento gênico para o versicam

Para o silenciamento gênico do versicam em células HTR-8/SVneo, foram plaqueadas em diferentes densidades, a depender do experimento a ser realizado em seguida, 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 (Fig. 6). O experimento se resume às seguintes etapas protocolares: após aderidas, as células foram lavadas com solução tampão fosfato salina (PBS) estéril (Sigma) e deixadas em meio de cultivo puro, sem suplementação, durante 24 h. Posteriormente, as células foram incubadas por 5 h 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* comercial, 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 350 μL dessa mistura por poço, em placas de 24 poços. Em seguida, as células foram incubadas com meio DMEM/F12 com aditivos em dobro por 30 minutos ou 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.

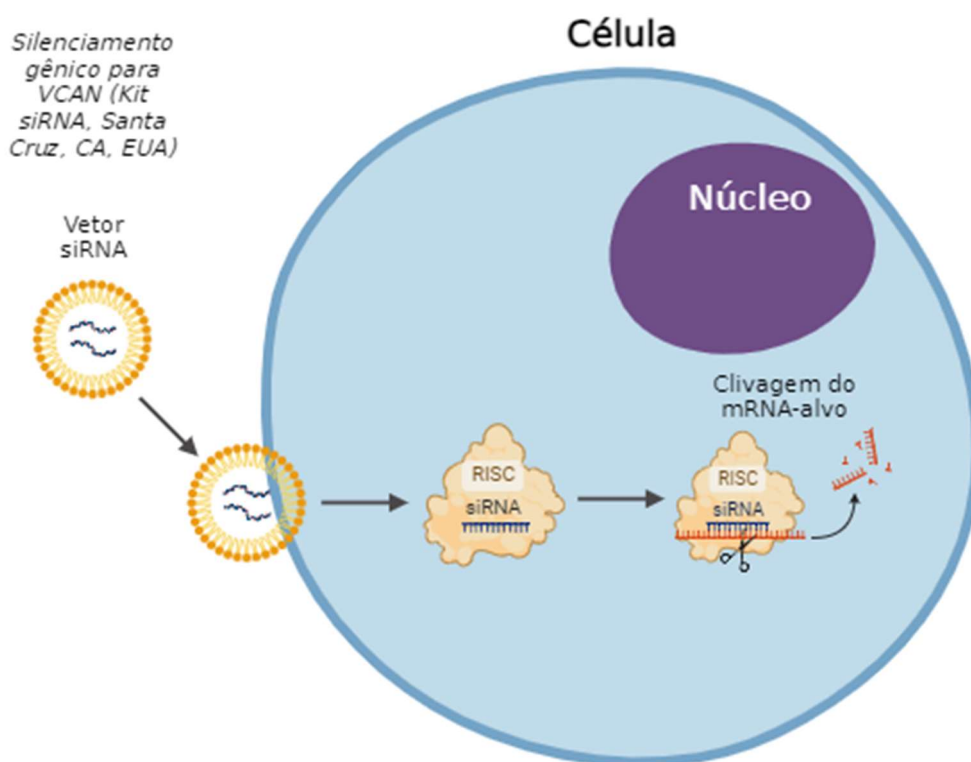


Figura 6. Ação do silenciamento gênico na célula. O siRNA entra na célula via vetor de lipofectamina; O siRNA liga-se a RISC (complexo silenciador induzido por RNA); as cadeias de siRNA são separadas; o complexo siRNA / RISC associa-se ao mRNA alvo e cliva-o. siRNA – RNA de interferência; siCt – RNA de interferência controle; mRNA – RNA mensageiro. Fonte: Autora.

4.3 Ensaio Imuno Enzimático (ELISA) para versicam

A quantificação da proteína total versicam no sobrenadante de células HTR-8/SVneo silenciadas ou não, foi realizada usando um kit comercial de ELISA (Novus Biologicals, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A absorvância óptica foi medida a 450 nm em um leitor de microplacas (Polaris, Celer Biotecnologia S.A.).

Resumidamente, foram adicionados 100 µL das amostras sobrenadante por poço, na microplaca de 96 poços fornecida no kit, as amostras foram incubadas por 90 minutos, a 37°C. Após esse período de incubação, as amostras foram retiradas dos poços e, então foi adicionado 100 µL da solução de trabalho do Anticorpo Biotinilado de Detecção para versicam, a seguir, as amostras foram incubadas por 1 hora, a 37°C. Posteriormente, o líquido foi aspirado, e adicionados 350 µL de tampão de lavagem em cada poço, essa solução foi deixada em contato com a placa de 1-2 minutos, depois aspirada e cada poço secado contra papel absorvente limpo. A etapa de lavagem foi repetida mais 3 vezes. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução de trabalho do Conjugado HRP a cada poço, e então a microplaca foi incubada durante 30 minutos, a 37°C. Após esse período, mais uma etapa de lavagem foi realizada, 5 vezes. Depois, foram adicionados 90 µL de Reagente de Substrato a cada poço, seguido de um período de incubação de 15 minutos, a 37°C, protegido da luz. Por fim, foram adicionados 50 µL de Solução de Parada a cada poço, seguido da leitura da densidade óptica (valor DO) de cada poço imediatamente com um leitor de microplacas ajustado para 450 nm.

4.4 Análise por *Western blot*

A extração de proteínas totais de células HTR-8/SVneo controle e células com VCAN silenciado foi realizada após lise em tampão de amostra (20% SDS, 10% glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 20% Tris HCl 0,7M e água destilada), contendo coquetel inibidor de proteases (P-8340, 1:100; Sigma). Os lisados foram diluídos 1:1 (v/v) em PBS, fervidos por 5 minutos a 95 °C e armazenados a -80 °C. As proteínas extraídas foram então separadas em géis de SDS/PAA a 10% e transferidas para membranas de PVDF (Hybond-ECL, RPN303D; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). PageRuler Plus (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) foi usado como marcador de tamanho molecular. O carregamento de proteína foi controlado corando

com solução de Ponceau S (0,1% (peso/volume) de Ponceau S, 5% de ácido acético em água destilada). Após bloqueio em leite 5%/TBS-Tween (0,05%), anticorpos anti-humanos de coelho ou camundongo dirigidos contra AKT total (0,1 µg/mL), p-AKT (Thr308, 0,2 µg/mL), p-AKT (Ser473, 0,2 µg/mL), p-mTOR (0,1 µg/mL), p-IRF-3 (0,2 µg/mL) e IRF-9 (0,2 µg/mL) foram adicionados. Para controlar o carregamento de proteína, as respectivas membranas foram re-incubadas com anticorpos anti-humanos de coelho contra α -tubulina (0,1 µg/mL, Cell Signaling). Anticorpos de cabra anti-rato ou anti-coelho IgG conjugados com peroxidase de rabanete (1:50000) foram usados como reagentes secundários. Sinais de peroxidase de rábano foram detectados pelo substrato de quimioluminescência aprimorada (ECL Plus Western Blotting Detection System; GE Healthcare, Piscataway, NJ) e visualizados digitalmente usando um sistema de documentação de gel (ChemiDoc XRS+ System, Bio Rad, Hercules, CA, EUA).

4.5 Análise por citometria de fluxo

As culturas de células HTR-8/SVneo foram analisadas por citometria de fluxo, para avaliação quantitativa da expressão do versicam, p-AKT Ser473, p-AKT Thr308, p-m-TOR Ser2448, p-IRF3 Ser396 e IRF9. Para tal metodologia, 3×10^5 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-p-AKT Ser473 (1:100, Cell Signaling), anti-p-AKT Thr308 (1:100, Cell Signaling), anti-p-m-TOR Ser2448 (1:250, Cell Signaling), anti-p-IRF3 Ser396 e anti-IRF9 (1:100, Cell Signaling) previamente conjugados com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com ficoeritrina PE (1:200). As análises foram realizadas em citômetro de fluxo FACS Canto™ II com o programa FACSDiva (BD Biosciences, New Jersey, EUA). Um total de 10.000 eventos foram adquiridos por amostra. Os dados obtidos foram analisados usando o programa FlowJo versão 8.7 (BD Biosciences).

4.6 Ensaio de videomicroscopia *Time-lapse* para análise de direcionalidade celular

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, em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Vanessa Morais Freitas. Resumidamente, após 24 h da realização do silenciamento gênico de VCAN, foram realizadas 17 h 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, Jena, 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.

4.7 Ensaio de invasão em cocultura 3D

Células endoteliais Ea.hy926 foram plaqueadas (5×10^4 células/poço) em dispositivos *Transwell* com poros de 8 μm (Millipore) em placa de 24 poços, revestidos com 15 μL de Matrigel (Sigma-Aldrich, Munique, Alemanha, 1:4 em PBS), por 48 h e 300 μL de meio DMEM/F12 com 10% de SBF (Sigma-Aldrich) foram adicionados aos compartimentos inferior e superior, respectivamente. Após a adesão das células e polimerização do Matrigel, foram adicionadas células HTR-8Sv/neo (2×10^4 células/poço) que, previamente foram submetidas ao protocolo de silenciamento gênico para versicam conforme descrito anteriormente. As células foram então incubadas com carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE, Thermo Fisher Scientific).

O CFSE foi adicionado a uma concentração de 1 μM e as células foram incubadas a 37 °C por 10 minutos, no escuro. Após isso, foi adicionado 5 volumes de meio de cultura gelado às células, e estas, foram incubadas, novamente, no gelo durante 5 minutos. Em seguida, a solução com células foi centrifugada a 800 g , por 7 minutos e depois lavadas duas vezes com meio de cultura, ressuspensas em meio DMEM/F12, adicionadas ao compartimento superior do dispositivo *Transwell*, o meio do compartimento inferior foi trocado por DMEM/F12 com 5% de SBF no

compartimento superior e 20% no compartimento inferior, e as células foram deixadas nos dispositivos durante 48 h.

Depois disso, as células foram lavadas com PBS, fixadas em paraformaldeído a 4%, lavadas novamente e incubadas com DAPI (DAPI; 1:1000 em PBS; Sigma-Aldrich) por 10 min em temperatura ambiente. As células presentes na superfície superior do inserto foram removidas suavemente com haste de algodão e as membranas cortadas com bisturi e, em seguida, montadas com PBS/glicerol (1:3) em lamínulas de vidro. As células positivas para CFSE e presentes em cinco campos de cada membrana foram contadas e analisadas digitalmente. A porcentagem de células invasivas foi calculada comparando a quantidade de células invasivas x totais nas membranas dos grupos.

4.8 Marcação para faloidina

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-Aldrich) 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 DAPI (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.

4.9 Análise por Microscopia de Força Atômica (AFM)

Imagens da morfologia celular e as medidas de elasticidade de células HTR-8/SVneo foram obtidas utilizando uma configuração padrão de Microscópio de Força Atômica (AFM) (Multiview 4000™, Nanonics, Israel), com um microscópio óptico combinado (BXFM, Olympus, Japão). A topografia celular foi capturada no modo de toque, e as imagens de AFM foram processadas com o *software* gratuito WSxM para visualização tridimensional. Além disso, a modificação de Sneddon do modelo Hertziano foi utilizada para caracterizar a curva força-deslocamento a fim de obter a indentação elástica das células. Todos os experimentos com curvas força-deslocamento foram realizados na região nuclear das células. Os experimentos de avaliação de topografia foram conduzidos utilizando uma ponta de varredura com um raio de curvatura típico de 10 nm, um cantilever de 125 µm de comprimento, uma

constante de mola entre 13 e 77 N/m e uma frequência nominal entre 200 e 400 kHz. Os experimentos de avaliação de elasticidade foram realizados com uma ponta de varredura com raio de curvatura de 2,5 µm, um cantilever de 100 µm de comprimento, uma constante de mola de 0,29 N/m e uma frequência nominal de 80 kHz. A constante de mola do cantilever foi calibrada ajustando o espectro de potência a um oscilador harmônico simples, e a força máxima de indentação para o cantilever foi definida em 20 nN. Todas as medições de curva força-deslocamento foram realizadas movendo a ponta do cantilever em direção à amostra com uma velocidade de carga constante de 5 µm/s. Foram adquiridas sessenta curvas força-deslocamento para cada grupo de células.

4.10 Extração de RNA e RT-PCR semi-quantitativo

O RNA total foi extraído das células plaqueadas (1×10^6 células/poço) utilizando Trizol® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), conforme especificações do fabricante. O RNA foi medido por um espectrofotômetro Biochrom Libra 22S (Biochrom, UK) e o cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg 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 (isoformas que são expressas pelas células HTR-8/SVneo). 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 dos *primers* para VCAN 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).

Primer	Sequência
GAPDH Forward	CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT
GAPDH Reverse	ACCCACTCCTCCACCTTTGA
Versicam V0 Forward	GCACAAAATTTACCCTGACAT
Versicam V0 Reverse	CTGAATCTATTGGATGACCAATTACAC
Versicam V1 Forward	TGAGAACCCTGTATCGTTTTGAGA
Versicam V1 Reverse	CTGAATCTATTGGATGACCAATTACAC
TGF-β1 Forward	GCCCTGGACACCAACTATTGC
TGF-β1 Reverse	GCTGCACTTGCAGGAGCGCAC
TGF-β2 Forward	TACAGACCCTACTTCAG
TGF-β2 Reverse	AAATCTTGCTCCTAGTT
TGF-β3 Forward	GCACTTGCAAAGGGCTC
TGF-β3 Reverse	TTGGCATAGTATTCCGA
ZEB-2 Forward	TCTCGCCCGAGTGAAGCCTT
ZEB-2 Reverse	GGGAGAATTGCTTGATGGAGC

Tabela 3. Sequências de *primers* para mRNA de GAPDH, isoformas de versicam e marcadores de TEM.

4.11 Imunofluorescência

Paras os experimentos de imunofluorescência, as células HTR-8/SVneo 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 h e, logo após, em PBS contendo 3% de glicina por 1h, para bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos primários anti-Pan-citoqueratina (Dako), anti-vimentina V-9 (0.1 μ g/mL, Abcam, Cambridge, UK), anti- β -catenina (1:100) (Cell Signaling, Danvers, MA, EUA), anti-E-caderina (1:50)

(Cell Signaling), anti-Snail (1:100) (Cell Signaling), anti-N-caderina (1:50) (Cell Signaling), anti-IRF3 (1:100, Cell Signaling), anti-IRF9 (1:100, Cell Signaling), anti-p-mTOR (1:250, Cell Signaling), anti-p-AKT Thr308 (1:100, Cell Signaling), anti-p-AKT Ser473 (1:100, Cell Signaling), anti-FAK (1:50, Santa Cruz) e anti-p-FAK Tyr576 (1:50, Santa Cruz), por 18 h a 4 °C. Após esse período de incubação, 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) (Thermo Scientific) durante 1 h a 37 °C. Os núcleos foram corados com 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI; 1:1000 em PBS; Sigma-Aldrich) e as lâminas foram montadas com PBS/glicerol. As imagens foram capturadas através do programa DP2-BSW (Olympus, Japão, versão 2.1), com o fotomicroscópio DS-Ri1 (Nikon, Japão).

4.12 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 analisadas pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Levene, respectivamente. Adicionalmente, as barras dos gráficos representam a média dos valores + erro padrão da média (SEM). Valores estatisticamente significantes foram considerados quando $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Eficiência do silenciamento gênico para versicam

O silenciamento gênico para versicam foi eficiente e se demonstrou capaz de reduzir substancialmente os níveis de mRNA das isoformas V0 e V1 de versicam, produzido pelas células HTR-8/SVneo, nos tempos experimentais de 24 h e 48 h (**Fig. 7 A**). Os níveis basais da isoforma V0 voltaram a ser reestabelecidos em 72 h após o silenciamento gênico, enquanto a isoforma V1 permaneceu consideravelmente baixa nos grupos silenciados para a proteína, em comparação com os grupos controle *scramble*. O gene GAPDH foi utilizado como controle endógeno do experimento.

A análise FACS demonstrou que os níveis proteicos de VCAN também foram acentuadamente reduzidos (**Fig. 7 B**). Em 24 h, os níveis de versicam passaram de 94.7% no grupo controle *scramble* para 6.11% nas células silenciadas para VCAN. Em 72 h essa redução se manteve, passando de 97.1% no grupo *scramble*, para 2.94% nas células submetidas ao silenciamento gênico de VCAN.

Para verificar se a produção de versicam solúvel pelas células HTR-8/SVneo foi afetada pelo silenciamento do gene, analisamos o sobrenadante celular por ensaio de ELISA. Foi constatado que o silenciamento gênico de versicam por siRNA foi capaz de reduzir os níveis deste proteoglicano no sobrenadante celular em 24 h (siVCAN), quando comparado ao grupo de controle *scramble* (**Fig. 8**).

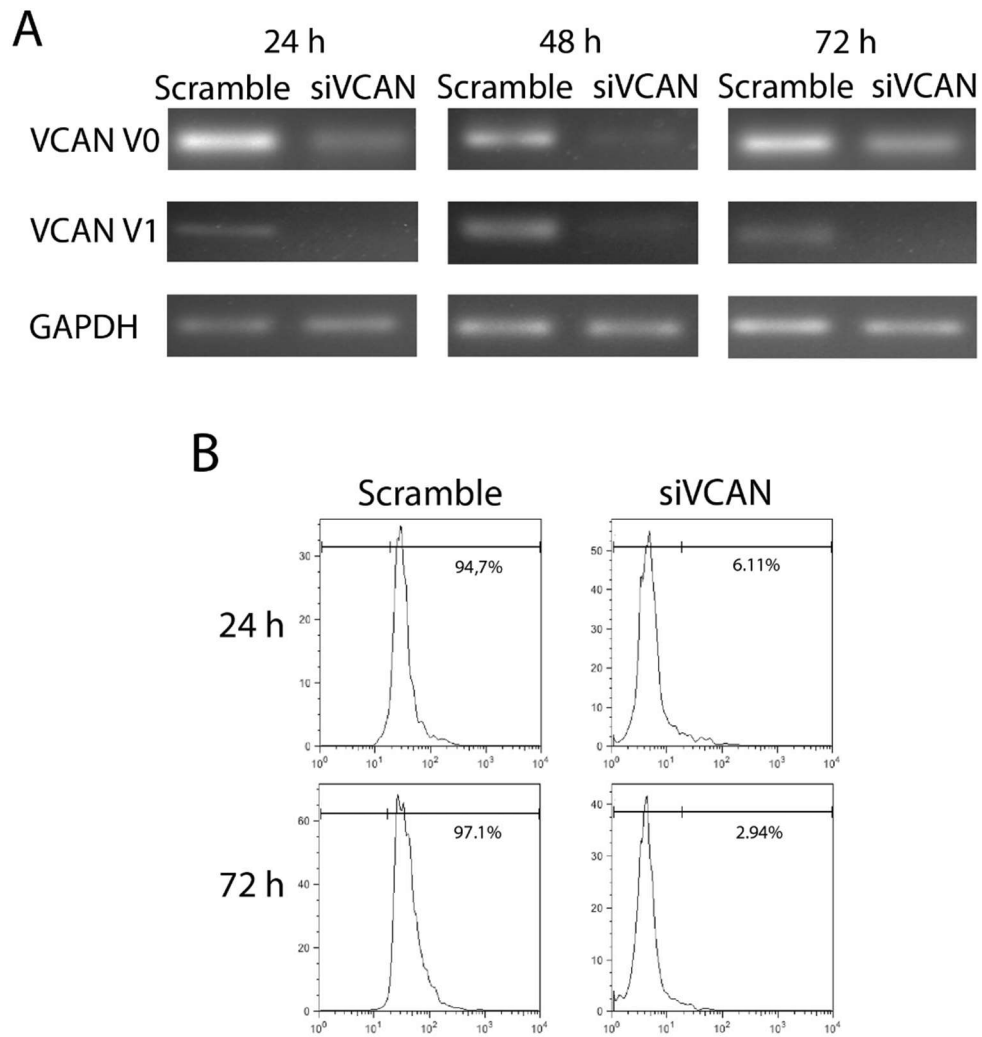


Figura 7. Análise da expressão gênica e proteica de versicam por RT-PCR e citometria de fluxo em células HTR-8/SVneo. A – Gel de eletroforese representativo dos produtos de PCR para as isoformas V0 e V1 de versicam e GAPDH, após 24h, 48h e 72h de silenciamento gênico para VCAN; B – níveis proteicos de VCAN de após 24h e 72h de silenciamento gênico. N= 3 em triplicatas.

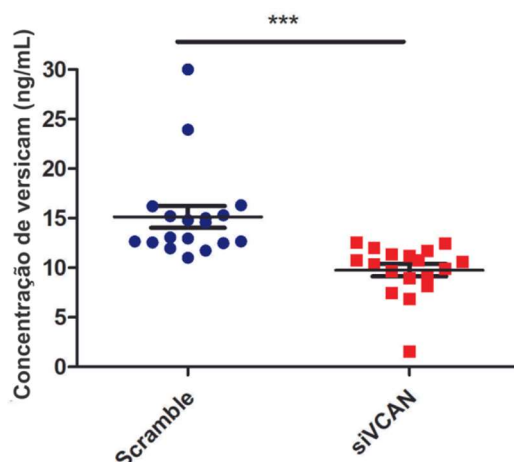


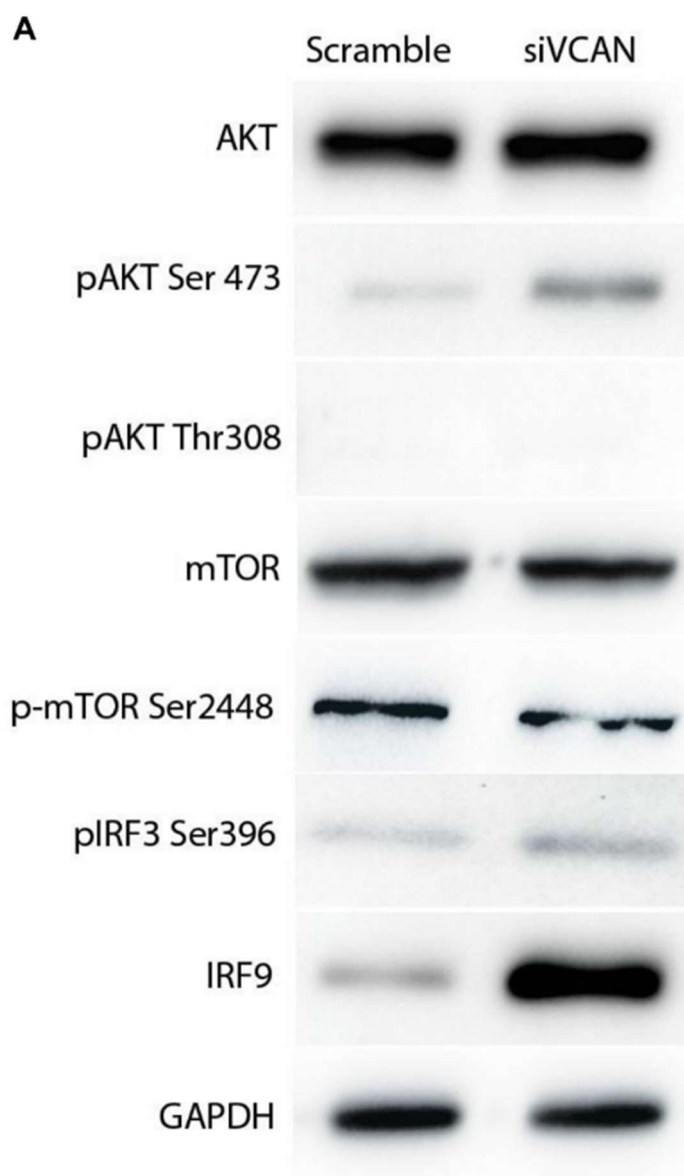
Figura 8. Níveis de versicam solúvel em células HTR-8/SVneo por ELISA. Concentração de versicam (ng/mL) em células do grupo controle *scramble* e células silenciadas para versicam por 24h (siVCAN). N=18. *** $p < 0.0001$.

5.2 Análise de sinalização celular por *western blot* e citometria de fluxo

Foram analisados os resíduos de fosforilação de AKT Thr308 e Ser473, por *western blot*, após 24 h de silenciamento de versicam. Não houve fosforilação de AKT Th308 nas células HTR-8/SVneo. Para AKT Ser473, foi possível observar um aumento na fosforilação após 24 horas de silenciamento ($p < 0.05$). Não houve diferenças na fosforilação de mTOR Ser2448 às 24 horas após a transfecção. Também foi avaliada a fosforilação dos fatores de transcrição IRF3 e IRF9. Foi possível observar uma tendência para aumento na fosforilação de IRF3 Ser396, mas isso não representou significância estatística nas análises. Quanto ao IRF9 total, foi possível observar um aumento significativo em sua expressão nas células HTR-8/SVneo silenciadas para o versicam ($p < 0.05$). O GAPDH foi utilizado como controle nestes experimentos (**Fig. 9 A – B**).

Também foram conduzidos experimentos de imunofluorescência a fim de avaliar o perfil de expressão de AKT Thr308 e Ser473, mTOR Ser2448, IRF3 Ser396 e IRF9 em células HTR-8/SVneo, após 24 h de silenciamento gênico para versicam. Os dados obtidos a partir das imunofluorescências corroboram com os resultados derivados das análises por *western blot* (**Fig. 10**).

A análise quantitativa dessas proteínas foi realizada por meio de citometria de fluxo (**Fig. 11**). Para pAKT Ser473, foi possível observar uma variação de 16.5% nas células do grupo controle *scramble*, para 27.4% siVCAN. Sustentando os dados de *western blot*, a expressão de p-AKT Thr308 foi de 2,8% em células controles, e de 2.41% em células silenciadas. Também não foram detectadas alterações na expressão de p-mTOR Ser2448 entre os grupos experimentais, em 24 h. Os dados quantitativos da expressão proteica de p-IRF3 Ser396 demonstraram uma variação de 21.6% no grupo controle, para 49.8% nas células silenciadas (siVCAN). Para IRF9 total, as análises mostraram um aumento substancial de 27.4% nas células HTR-8/SVneo do grupo controle, para 70.7% nas células siVCAN.



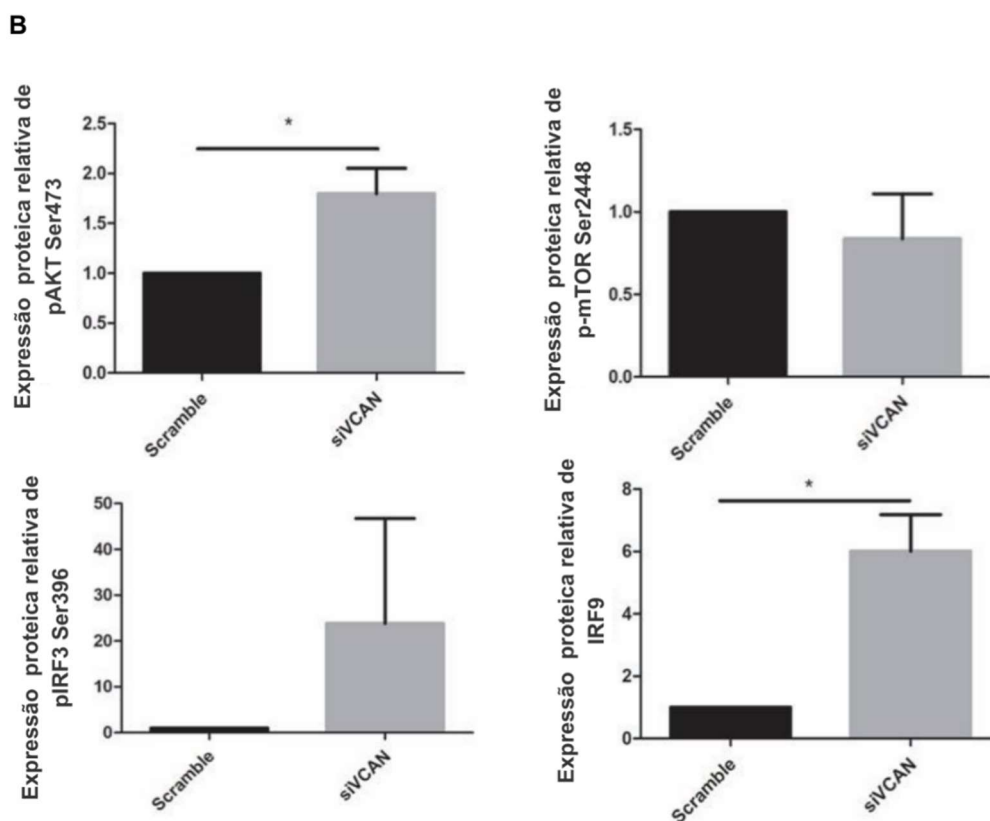


Figura 9. Avaliação de vias de sinalização por *western blot*. A – Imagens representativas dos *blots* em gel de poliacrilamida para a expressão de AKT total, AKT Ser473, AKT Thr308, mTOR total, mTOR Ser2448, IRF3 Ser396, IRF9 e GAPDH em células HTR-8/SVneo controle *scramble* e silenciadas para versicam (siVCAN) em 24h; B – Avaliação quantitativa dos *blots* referentes a AKT Ser473, mTOR Ser2448, IRF3 Ser396 e IRF9 em relação ao GAPDH, em células HTR-8/SVneo controle *scramble* e silenciadas para versicam (siVCAN) em 24h. N=3 em triplicatas. * $p < 0.05$.

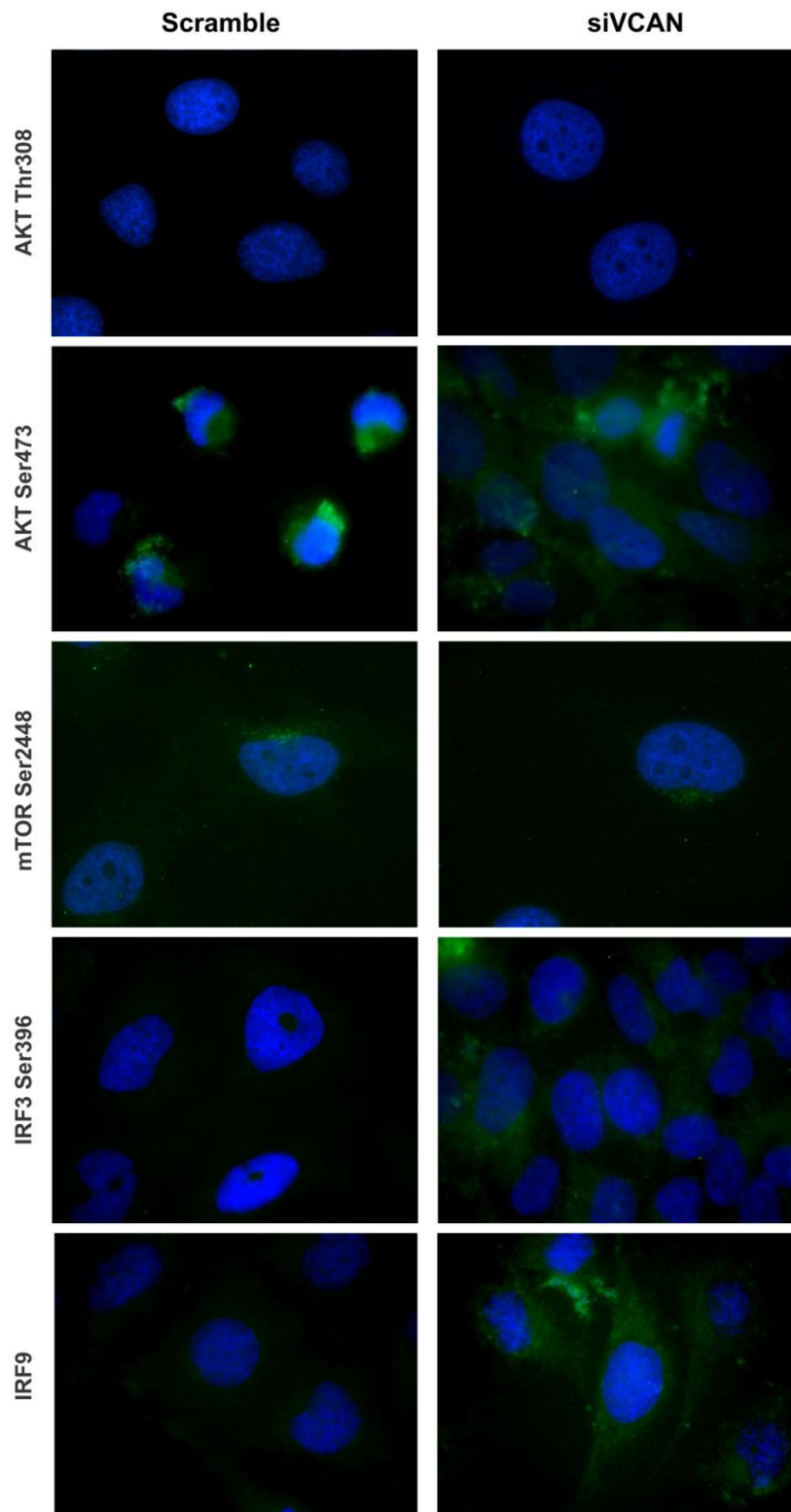


Figura 10. Imunofluorescências para vias de sinalização. Proteínas alvo: AKT Thr308, AKT Ser473, mTOR Ser2448, IRF3 Ser396 e IRF9 em células HTR-8SVneo controle *scramble* e silenciadas para versicam (siVCAN) em 24h. Verde – proteínas alvo; azul – DAPI. N=3 em triplicatas. Ampliação 100x.

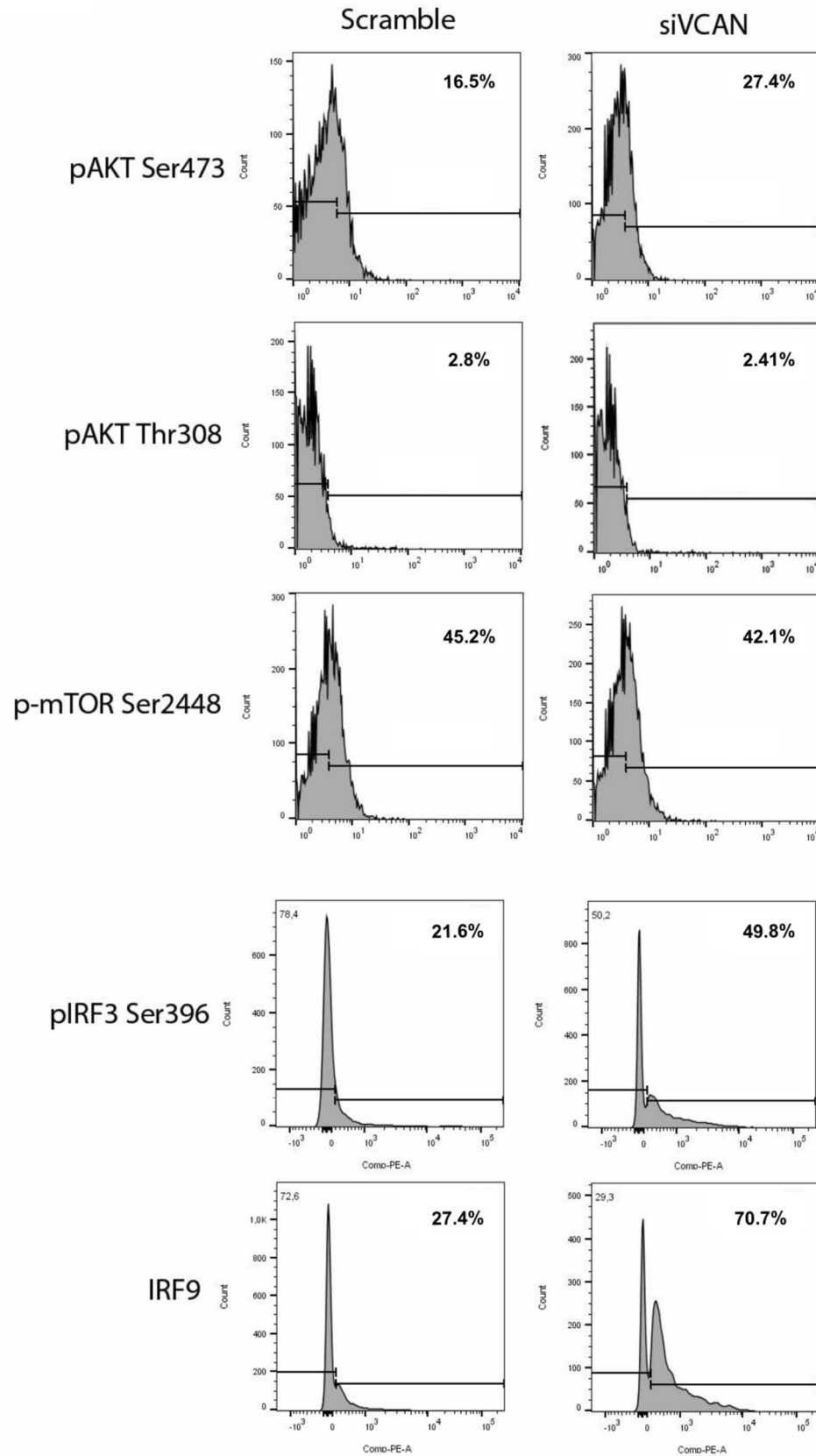


Figura 11. Análise FACS para vias de sinalização. Níveis proteicos celulares de AKT total, AKT Ser473, AKT Thr308, mTOR total, mTOR Ser2448, IRF3 Ser396 e

IRF9 em células HTR-8/SVneo controle *scramble* e silenciadas para versicam (siVCAN) em 24 h. N= 3 em triplicatas.

5.3 Análise de direcionalidade celular

Dados anteriormente obtidos pelo nosso grupo de pesquisa (Gonçalves, 2019), demonstraram que a ausência de versicam foi capaz reduzir substancialmente a migração e interferir na velocidade de migração de células HTR-8/SVneo.

Uma vez que a ausência deste proteoglicano gerou efeitos na migração de células HTR-8/SVneo, buscamos avaliar o efeito da supressão de versicam na direcionalidade de células da linhagem HTR-8/SVneo. Os dados de videomicroscopia *time-lapse* permitiram acessar a direcionalidade das células HTR-8/SVneo, célula a célula, por meio do *software* Origin® (Northampton, Massachusetts, USA). Observamos que as células do grupo controle apresentaram um padrão de migração característico (cada linha colorida no gráfico representa uma única célula); enquanto as células do grupo silenciado (siVCAN) exibiram um padrão de movimentação totalmente incomum, como se não houvesse um padrão (**Fig. 12**), sugerindo, assim, que a ausência do VCAN pode influenciar o comportamento de migração e de motilidade das células HTR-8/SVneo.

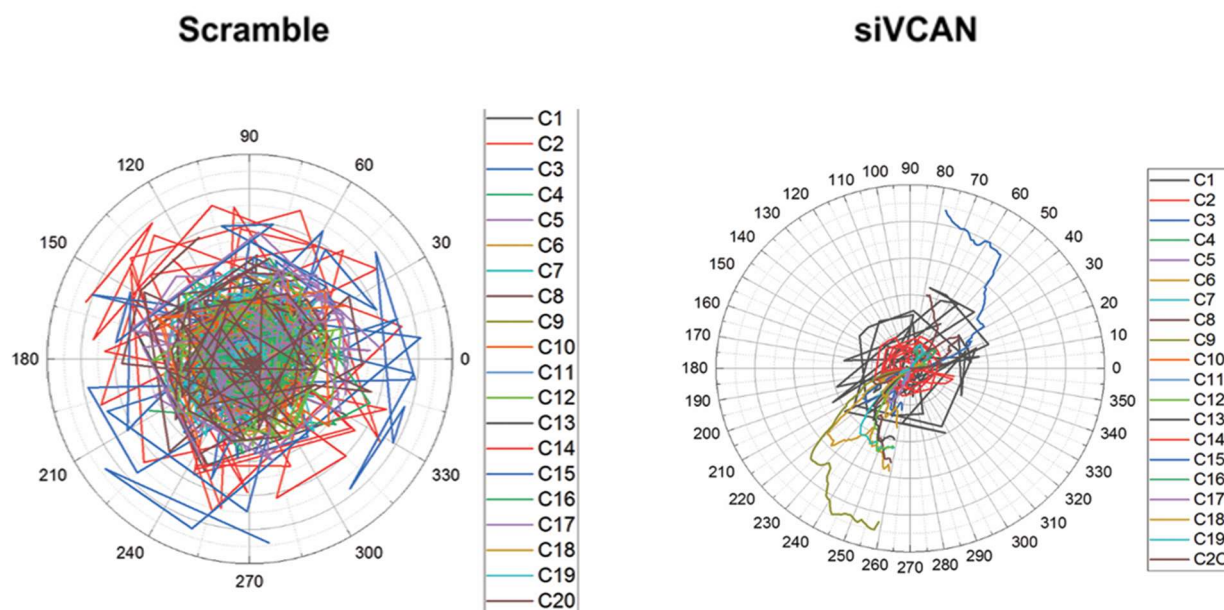


Figura 12. Perfil de direcionalidade de células HTR-8/SVneo. Gráficos gerados a partir de dados de videomicroscopia time-lapse de células do grupo controle *scramble* e silenciadas para versicam por 24h (siVCAN). Cada linha colorida representa a trajetória de uma célula individual.

5.4 Análise de adesão celular

A adesão é um processo essencial no contexto da motilidade celular e é um mecanismo dependente das interações entre as células e a MEC. Desta forma, alterações na dinâmica da adesão celular podem gerar impacto intensamente a funcionalidade celular.

A análise por imunofluorescência revelou diferenças significativas na expressão das proteínas FAK total e pFAK (FAK fosforilada) entre os grupos experimentais, após 30 minutos de realizado o silenciamento gênico para VCAN. O grupo *scramble* apresentou maior quantidade de FAK total, disposta de forma homogênea em toda área citoplasmática da célula, em comparação com o grupo siVCAN, que apresentou uma expressão menos intensa no citoplasma. Por outro lado, no grupo siVCAN, foi observado um aumento na proporção de FAK fosforilada (pFAK), demonstrando mais pontos de adesão dispostos na periferia celular, em relação ao grupo controle *scramble* (Fig. 13).

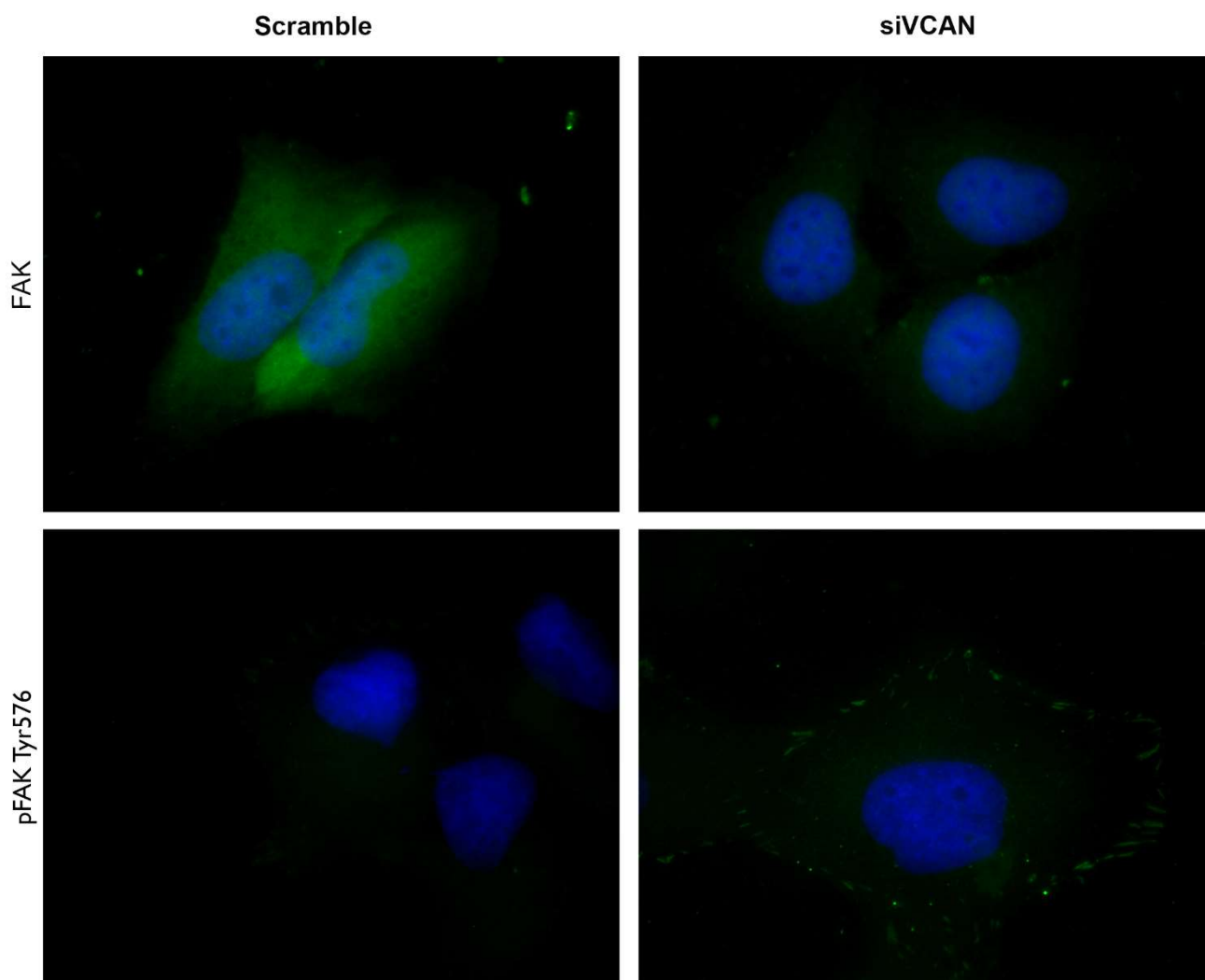


Figura 13. Expressão de FAK e pFAK Tyr576 por imunofluorescência. Imagens representativas de imunomarcacão para FAK total e pFAK Tyr576 em células HTR-8/SVneo do grupo controle *scramble*, e silenciadas para VCAN (*siVCAN*), após 30 minutos. Ampliação 100x. Verde – proteínas-alvo; azul – DAPI. N = 3. Barra de escala: 1cm. Ampliação: 100x.

5.5 Análise de invasão celular em Matrigel

Continuando a avaliação de propriedades de motilidade das células, nós também utilizamos outra metodologia para verificar a capacidade de invasão da linhagem HTR-8/SVneo. Para este ensaio funcional, também foram utilizadas células endoteliais da linhagem EA.hy926, misturadas com Matrigel no topo dos dispositivos *transwell*, e depois destas células chegarem a uma confluência total, adicionadas aos dispositivos células HTR-8/SVneo marcadas com CFSE, silenciadas ou não para

versicam. Depois de 48h, as células que permaneceram no topo dos dispositivos foram retiradas, as membranas coradas com DAPI e, em seguida, foram registradas imagens para a contagem de células invasivas. A quantificação revelou que o silenciamento gênico de VCAN reduziu de modo substancialmente significativo a capacidade invasiva de células HTR-8/SVneo através de células endoteliais EA.hy926 e Matrigel (**Fig. 14**); variando de 60.92% no grupo controle, para 14.06% no grupo silenciado (siVCAN) ($p < 0.01$).

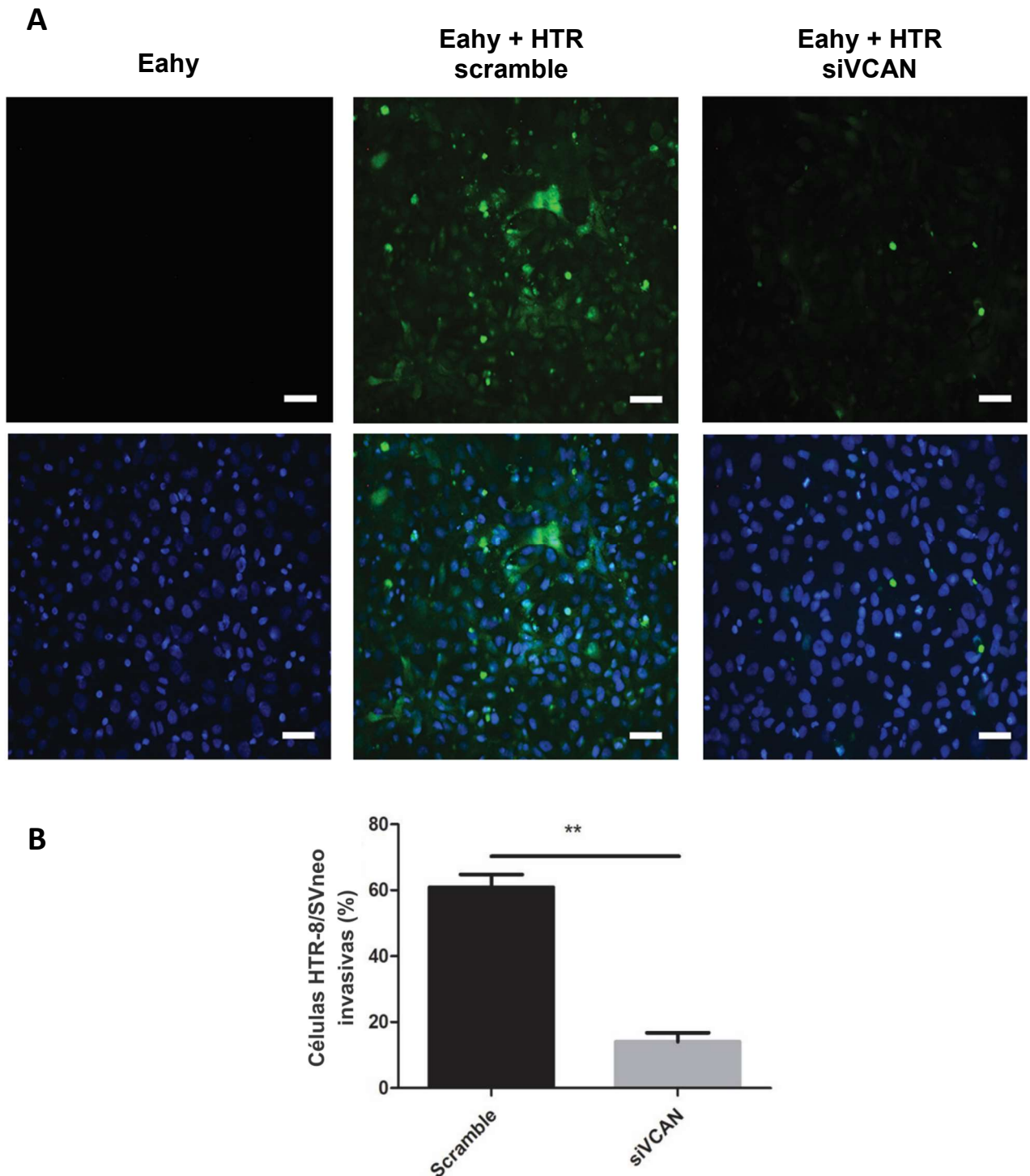


Figura 14. Análise de invasão celular em dispositivo *Transwell* em coating de Matrigel e células da linhagem EA.hy926. A – Imagens representativas das membranas, grupos EA.hy926, EA.hy926 e células HTR-8/SVneo controle *scramble* e silenciadas para versicam por 24h (siVCAN). Verde – CFSE; Azul – DAPI. Ampliação 40x. B - Percentual das células HTR-8/SVneo invasivas do grupo controle *scramble* e silenciado (siVCAN). N=3. ** $p < 0.01$.

5.6 Análise por Microscopia de Força Atômica (AFM)

As células silenciadas para VCAN apresentaram uma maior rigidez quando comparadas às células do grupo controle; o deslocamento da curva das células HTR-8/SVneo submetidas ao silenciamento gênico (siVCAN) foi de 16.47 ± 0.88 kPa, ficando mais próxima da curva que representa a superfície do vidro, utilizado como referência para as medições, enquanto o deslocamento da curva nas células controles foi de 12.66 ± 0.39 kPa (**Fig. 15 A**). Adicionalmente, o Módulo de Young das células silenciadas foi 30,09% superior ao das células do grupo controle *scramble* ($p < 0,01$) (**Fig. 15 B**).

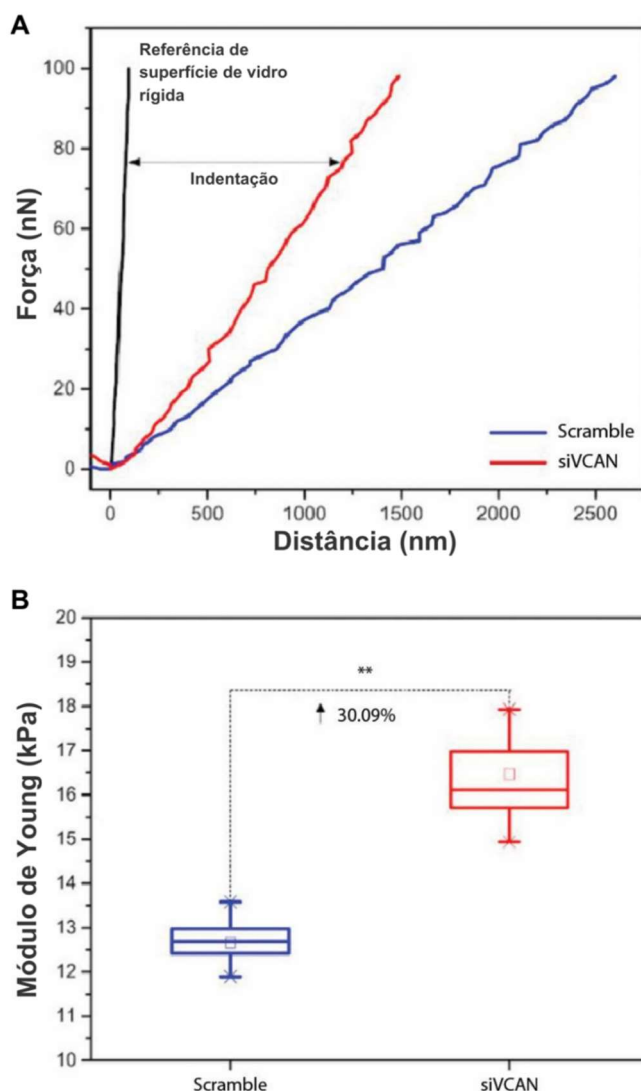
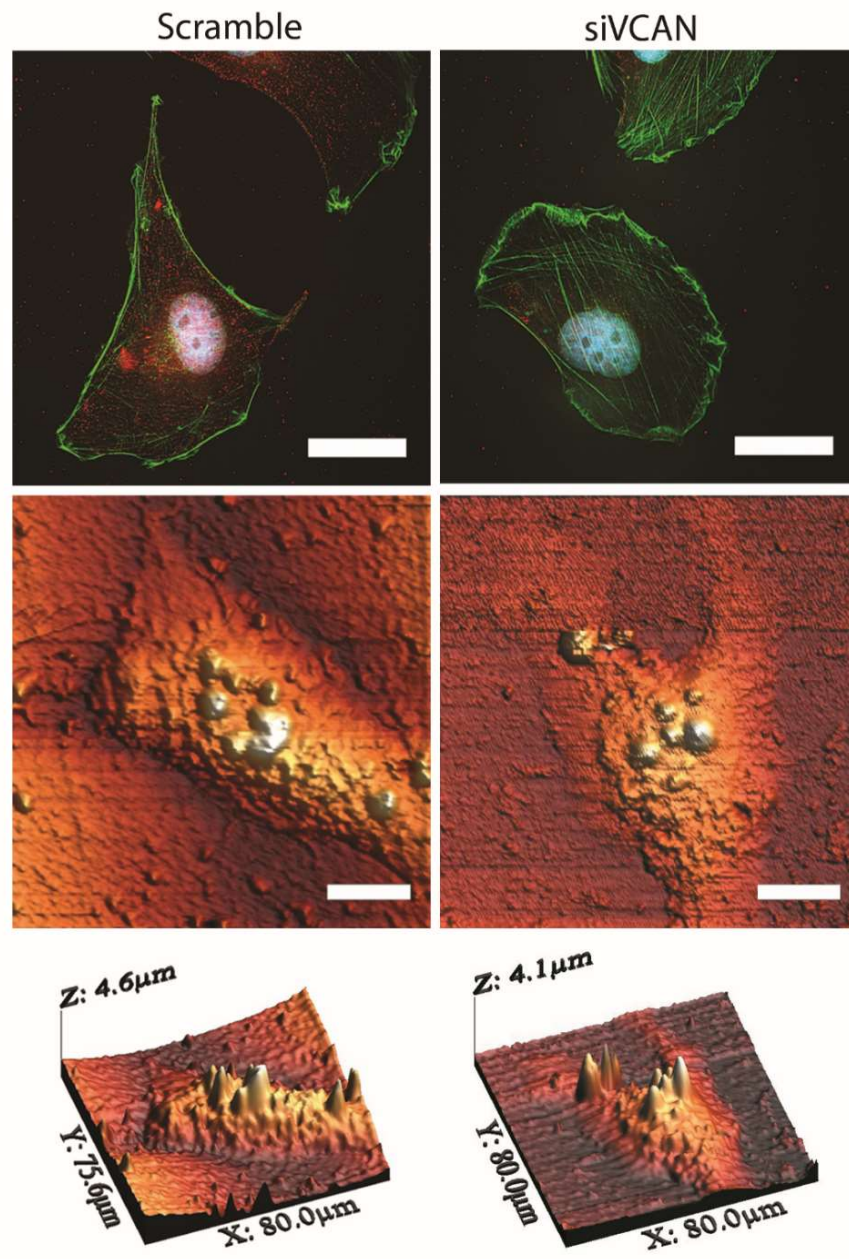


Figura 15. Análise de parâmetros morfológicos por Microscopia de Força Atômica (AFM). A – Gráfico de elasticidade de membrana plasmática de células HTR-8/SVneo controles *scramble* e células com ausência de versicam (siVCAN); B – Gráfico com os valores do Módulo de Young em células HTR-8/SVneo do grupo controle *scramble* e silenciadas para VCAN (siVCAN). N=60 células em 3 experimentos distintos. ** $p < 0.01$.

Alterações morfológicas também puderam ser avaliadas por meio da marcação de filamentos de actina com faloidina e por AFM. A marcação com faloidina evidenciou mudanças significativas na morfologia das células HTR-8/SVneo; as células silenciadas para versicam por 24h apresentaram uma importante redução na polimerização da F-actina na periferia do citoplasma dessas células (**Fig. 16 A**);

enquanto as células do grupo controle mantiveram um padrão mais difuso de marcação. As imagens geradas por meio das medições feitas pela sonda representam uma mudança no tamanho das células HTR-8/SVneo, sendo as células silenciadas (siVCAN) menores quando comparadas às células do grupo controle. As células silenciadas também apresentaram uma redução da sua altura, passando de 6,7 μ m no grupo controle, para 4,6 μ m nas células siVCAN (**Fig. 16 B**).

A



B

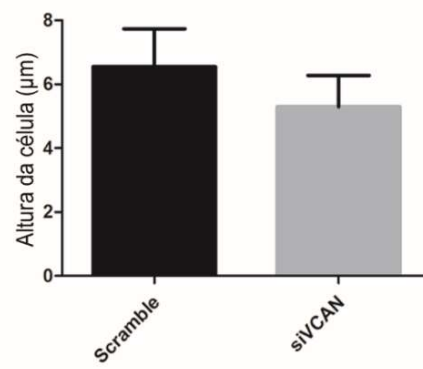


Figura 16. Análise morfológica de citoesqueleto de F-actina e topográfica em células HTR-8/SVneo. Marcação com faloidina. Células HTR-8SVneo controle *scramble* e células silenciadas para versicam (siVCAN) por 24h; Verde – faloidina; Vermelho – VCAN; Azul – DAPI. Ampliação 100x. Imagens representativas de parâmetros morfológicas obtidos por sonda AFM. B – Gráfico de quantificação da altura, em μm , de células HTR-8/SVneo do grupo controle *scramble* e silenciadas para versicam (siVCAN).

5.7 Análise de sinalização de TEM por RT-PCR e imunofluorescência

Como diferentes parâmetros relacionados à morfologia e motilidade foram alterados com a ausência de versicam, nós buscamos avaliar a influência desse proteoglicano na expressão de alguns genes e proteínas envolvidos na transição epitélio-mesenquimal, afim de elucidar se o VCAN está, de alguma forma relacionado este processo celular.

Os experimentos de RT-PCR revelaram que o silenciamento gênico de VCAN não foi capaz de alterar a expressão de TGF- β 1 em células HTR-8/SVneo, e TGF- β 3, que não demonstrou expressão tanto no grupo controle, quando nas células silenciadas (siVCAN); já a expressão de mRNA de TGF- β 2 foi totalmente anulada nas células submetidas ao silenciamento. O grupo de células controle não demonstrou expressão de ZEB2, enquanto o silenciamento gênico de VCAN resultou na ativação da expressão de mRNA para este fator de transcrição. GAPDH foi utilizado como controle endógeno para este experimento (**Fig. 17**).

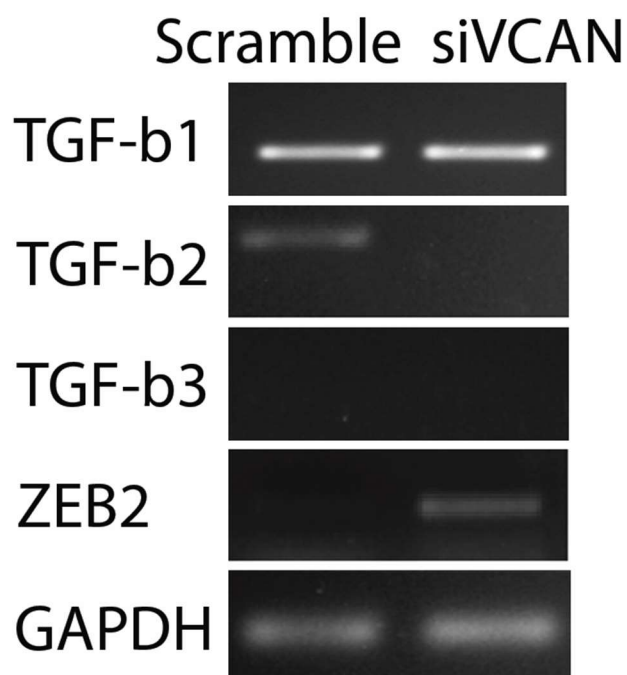


Figura 17. Expressão gênica de marcadores de TEM. Níveis relativos de mRNA de TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 e ZEB2 em células HTR-8/SVneo do grupo controle *scramble* e silenciadas para versican por 24h (siVCAN). N= 3.

A partir dos dados obtidos quanto a expressão gênica, nós buscamos investigar, por meio de ensaios de imunofluorescência, a expressão de outras proteínas e fatores de transcrição envolvidos no processo de TEM (**Fig. 18**), após 24 h de experimento.

A E-caderina apresentou uma expressão discreta e difusa por todo citoplasma nas células do grupo controle *scramble*. Já nas células do grupo silenciado, essa marcação se demonstrou mais intensa e mais concentrada na região perinuclear das células HTR-8/SVneo. Em células do grupo controle, a expressão de β -catenina se demonstrou menor e mais concentrada como grânulos nos núcleos celulares. Nas siVCAN, essa marcação se repetiu mais discretamente e também contendo algum aumento de marcação em algumas regiões da periferia celular. Para Snail, houve marcação intensa, tanto granular nos núcleos celulares, em células do controle *scramble*; nas células siVCAN, apresentaram uma redução quase completa na intensidade de marcação desse fator de transcrição. Houve alteração da expressão de Pan-citoqueratina em células do grupo silenciado, que apresentaram um aumento na intensidade de marcação, quando comparada às células do grupo controle. Nessa situação também foi possível perceber uma certa mudança na morfologia celular, com as células do grupo silenciado demonstrando um formato mais circular, em

comparação com as células controles, com um formato muitas vezes fusiforme. Por último, analisamos a expressão de vimentina e observamos que as células submetidas ao silenciamento gênico de versicam perderam quase que totalmente a expressão dessa proteína, quando comparadas ao grupo controle *scramble* de células HTR-8/SVneo 24h pós transfecção (**Fig. 18**).

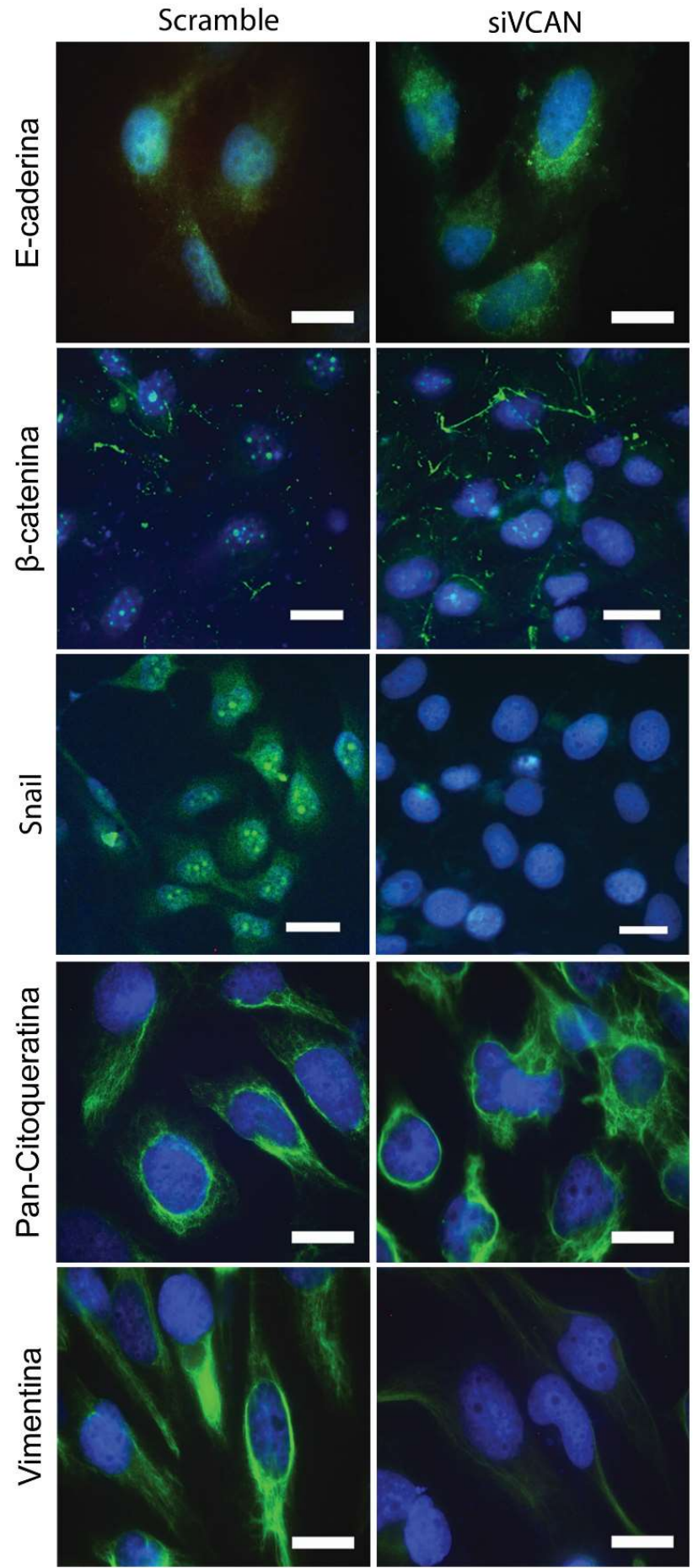


Figura 18. Expressão de marcadores de TEM por imunofluorescência. Imagens representativas de imunomarcação para E-caderina, β -catenina, Snail, Pan-Citoqueratina e vimentina em células HTR-8/SVneo do grupo controle *scramble*, e silenciadas para VCAN (siVCAN), após 24h. Ampliação 100x. Verde – proteínas-alvo; azul – DAP-I. N = 3. Barra de escala: 1cm. Ampliação: 100x.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o impacto do VCAN na TEM e na motilidade de células trofoblásticas da linhagem HTR-8/SVneo. Utilizando o silenciamento gênico como ferramenta experimental, realizamos um mapeamento funcional das principais vias reguladas por VCAN, permitindo a identificação de potenciais alvos terapêuticos para a modulação de processos invasivos na PAS e outras patologias relacionadas a disfunções de motilidade de células trofoblásticas.

O protocolo de silenciamento gênico utilizado foi considerado eficiente. As células trofoblásticas HTR-8/SVneo expressaram as isoformas V0 e V1 de VCAN e foi demonstrada uma considerável eficiência do silenciamento gênico, em níveis proteicos e de mRNA das isoformas V0 e V1. Corroborando os dados verificados por RT-PCR e análise FACS, os níveis solúveis de VCAN total também se demonstraram reduzidos após 24 h de silenciamento gênico, indicando que o mecanismo de ação autócrina e parácrina do versican possivelmente é afetado. Estudos silenciando o VCAN em células mostram que sua presença é essencial na regulação da biologia de células neoplásicas (Carthy *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Keire e colaboradores (2016) realizaram *knockdown* de VCAN em células de leiomiossarcoma, e detectaram uma redução de aproximadamente 85% nos níveis de mRNA, e de 95% nos níveis proteicos das isoformas V0 e V1 de VCAN, em 48 h após a transfecção. Já Wei e colaboradores (2017), obtiveram 60% de redução dos níveis de proteína de VCAN, por meio do uso de siRNA, 48 h pós transfecção em células da linhagem SCC15, proveniente de carcinoma de células escamosas da língua. Em células Bewo, nosso grupo demonstrou que o silenciamento gênico de VCAN gerou uma redução média de 73.8% dos níveis proteicos de VCAN, e de 60.3% dos níveis de mRNA, após 24h de transfecção (Pires *et al.*, 2019). Esses resultados indicam que o modelo de HTR-

8SVneo funciona bem para o tipo de silenciamento proposto, sendo importante para futuros estudos envolvendo o papel funcional do VCAN na biologia das células trofoblásticas.

Nossos resultados de sinalização celular mostraram que não houve detecção da fosforilação de AKT Thr308 em células HTR-8/SVneo, após 24 h de silenciamento gênico de VCAN, mas revelaram um aumento dos níveis proteicos de AKT Ser473. Tais achados podem indicar uma possível especificidade na regulação da fosforilação de AKT em células HTR-8/SVneo nesse modelo experimental, e sugerem que a presença ou ausência de VCAN pode modular seletivamente a ativação de AKT em diferentes sítios de fosforilação. A ativação da via de sinalização PI3K/AKT no contexto de promoção da motilidade trofoblástica, foi demonstrado em função de diferentes fatores como Wnt, gonadotrofina coriônica (hCG), EGF e IGF-II (fator de crescimento semelhante a insulina II) (Cartwright *et al.*, 2002; Knöfler, 2010; Prast *et al.*, 2008; Qiu *et al.*, 2005; Sonderegger *et al.*, 2010). Tendo sido descrita a ativação de AKT por diversos fatores de crescimento, mediada pela fosforilação de ambos os resíduos Thr308 e Ser473 (Jacinto *et al.*, 2006), os quais fosforilam o alvo do complexo 1 de rapamicina em mamíferos (mTORC1), também descrito como promotor de invasão trofoblástica (Busch *et al.*, 2009). A não detecção de AKT Thr308 sugere que outros mecanismos podem estar envolvidos na regulação da atividade de AKT neste contexto específico. Dentro do contexto do microambiente placentário, estudos demonstraram que a ativação da via PI3K/Akt possui um importante papel na regulação da migração, invasão e angiogênese de células trofoblásticas, além de estar correlacionada com o transporte de aminoácidos, ácidos graxos e glicose (LEE *et al.*, 2006; Prast *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2007; Burton e Jauniaux, 2018). O aumento da expressão de p-AKT Ser473 em células HTR-8/SVneo, na ausência de VCAN, pode estar relacionado à capacidade de proliferação, uma das funções gerais exercidas por esta via de sinalização (Knöfler *et al.* 2010), mantida por esta linhagem celular, mesmo quando submetidas ao silenciamento de VCAN por 24 h (Gonçalves, 2019).

Com relação a IRF-3, em células trofoblásticas, ela se faz importante pelo seu papel regulador na produção de IFN- β , mecanismo necessário em uma situação de defesa e manutenção da tolerância imunológica durante a gestação (Kwon *et al.*, 2018). Nossos resultados mostraram uma tendência de aumento da expressão de

pIRF3 Ser396 na ausência de VCAN, o que pode sinalizar uma potencial redução da produção de IFN- β em células HTR-8/SVneo. Interessantemente, o eixo IRF-3/IFN- β /VCAN reduzido em células de câncer de mama triplo-negativo contribui para a regressão do fenótipo mais agressivo e mesenquimal, reduzindo a TEM (Doherty *et al.*, 2017). No entanto, uma limitação do presente estudo é que não foi avaliada a expressão de IFN- β para comprovar esta hipótese. Por outro lado, em células de câncer de pâncreas, o IRF-3 atua como modulador na expressão de circUHRF1, sendo um fator-chave na progressão tumoral deste tipo de neoplasia (Liu *et al.*, 2022).

Outra via analisada foi a de IRF-9. A ausência de VCAN resultou em aumento da fosforilação de IRF9 no grupo silenciado. Brunn e colaboradores (2021) demonstraram que VCAN é um alvo *downstream* de IRF-9 em células de adenocarcinoma de pulmão, aumentando os efeitos de migração e progressão tumoral. Nesse contexto, o IRF-9 aumentado no grupo silenciado, mostra uma tentativa da célula de, na ausência de VCAN, aumentar fatores que possam resgatar a produção e VCAN, como o IRF-9.

Além dos ensaios funcionais, *in vitro*, mais comumente executados, tais como ensaios de migração, invasão, proliferação, adesão e outros, os ensaios de avaliação de direcionalidade podem ser extremamente úteis para a compreensão mais abrangente do comportamento de motilidade celular. Montenegro e colaboradores (2017) demonstraram que o bloqueio da expressão de integrina $\alpha\text{V}\beta 3$, promoveu um efeito redutor e repressor na direcionalidade de migração em células de carcinoma escamoso oral, dessa forma, modificando seu comportamento de migração, de um padrão de migração individual, rápido e persistente, para uma migração circular e com tendência de coletividade (células migrando em pares), o que foi descrito como um possível efeito do bloqueio da integrina $\alpha\text{V}\beta 3$ nas propriedades adesivas em células tumorais da linhagem SCC25. Da mesma forma, Tamborindeguy e colaboradores (2023) demonstraram que a assimetria no processo de mitose em células de câncer pode gerar populações de células com capacidades migratórias diferentes, influenciando, assim seu comportamento e potencial de metástase e invasão.

Durante toda a gestação, as células trofoblásticas mantêm um equilíbrio dinâmico nos processos de adesão e invasão (Wang *et al.*, 2017). Nossos resultados demonstraram que o *knockdown* de VCAN promoveu uma redução da expressão de FAK, quanto aumentou a expressão de pFAK, indicando uma capacidade aumentada

de adesão de células HTR-8/SVneo, quando submetidas ao silenciamento de VCAN. O VCAN é um PG envolvido na regulação de diversos eventos celulares, incluindo a adesão, por meio da interação com integrinas e receptores de membrana (Papadas *et al.*, 2020), tais interações são capazes de modular a expressão de FAK, essencial na sinalização de adesões focais (Carthy *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2015).

No contexto do presente trabalho, a expressão de VCAN contribui para a expressão de FAK e sua estabilidade de expressão, enquanto a supressão deste PG, em células HTR-8/SVneo promoveu uma menor síntese ou maior degradação desta proteína, provavelmente por uma redução de sinalização mediada pela MEC. Apesar de uma redução nos níveis de FAK total, o aumento de pFAK no grupo silenciado pode ocorrer devido a mudanças no microambiente celular. Nesse sentido, o silenciamento de VCAN pode gerar estresse mecânico ou mudanças na dinâmica das adesões focais, levando à hiperfosforilação da FAK residual como mecanismo compensatório, a fim de adaptar a célula ao impacto na comunicação célula-matriz devido a ausência de VCAN.

A relação entre a expressão de VCAN e a sinalização FAK/pFAK pode ser elucidada por meio diferentes estudos que destacam os mecanismos envolvidos. Carthy e colaboradores (2015) demonstraram que a superexpressão da isoforma V1 de VCAN em fibroblastos levou ao aumento da fosforilação de FAK, que foi correlacionada com a expressão aumentada de marcadores de miofibroblastos, como α -actina de músculo liso e integrina $\beta 1$. Além disso, a regulação de VCAN mediada por miRNA foi implicada na modulação da sinalização FAK. Gupta e colaboradores (2020) demonstraram que o miR-144 direcionado ao VCAN inibe as vias de sinalização FAK em células de mieloma múltiplo, sugerindo um papel potencial de supressão tumoral para o miR-144 neste contexto. Em conjunto, estes resultados indicam que o VCAN não apenas influencia o comportamento celular, mas também interage com as vias de sinalização que regulam a atividade de FAK, enfatizando ainda mais seu papel na dinâmica da MEC.

Estudos anteriores do nosso grupo associaram a ausência de VCAN a uma menor migração e velocidade celular (Gonçalves, 2019). Aqui, complementamos o estudo com a análise de direcionalidade celular. A ausência de VCAN gerou um padrão bastante incomum de movimentação destas células, o que influencia na menor

velocidade e migração observadas anteriormente. Nosso ensaio de invasão vascular 3D corroborou essa hipótese, com uma menor invasão das células silenciadas. Li e colaboradores (2021) demonstraram que a supressão de VCAN foi capaz de reduzir a migração e invasão de células de câncer de mama. Catarruzza e Perris (2005) descrevem como diferentes PGs, em associação com a MEC, são capazes de modular o comportamento de movimentação das células, contribuindo para criar no microambiente, uma estrutura de MEC mais ou menos favorável a movimentação e migração. Assim, seria atribuído aos PGs a propriedade de impor direcionalidade às células em movimento. Da mesma forma, Ricciardelli e colaboradores (2007), demonstraram que células de câncer de próstata, condicionadas a formarem uma matriz pericelular rica em HA e VCAN, apresentaram um aumento de motilidade em substrato de fibronectina; tal acúmulo de HA e VCAN neste tipo celular, foi observado com maior evidência nas extremidades posteriores das células, o que permite a atração e ligação a componentes na MEC subjacente, tais como a fibronectina. Ou seja, as células sem a presença de VCAN não somente possuem a sua motilidade reduzida, mas também a polarização celular necessária para que a migração ocorra, não acontece ou acontece de forma ineficiente.

Nesse contexto, a elasticidade da membrana plasmática é importante para a polarização e motilidade celular (Itoh e Tsujita, 2023). Nossos resultados evidenciam que a ausência de VCAN torna as células mais rígidas, indicando alterações biomecânicas e morfológicas que sugerem um papel importante nas características estruturais e dimensionais das células. Estudo prévio do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o silenciamento gênico de VCAN é capaz de reduzir a ativação da via de sinalização RhoA/ROCK2 (Gonçalves, 2019). Essa via de sinalização é essencial para a organização de citoesqueleto, polarização e motilidade celular (Hartman *et al.*, 2015).

Visto que a sinalização de AKT e IRF foram alteradas, assim como a motilidade celular foi fortemente alterada pela ausência do versicam, analisamos também o perfil de marcadores de TEM. Outrossim, a expressão gênica de TGF- β 2 foi completamente reduzida no grupo siVCAN, quando comparado ao grupo controle. Paruchuri e colaboradores (2006) demonstraram que a presença de TGF- β 2 contribui para a diferenciação de células fetais humanas, induzindo a transformação para um fenótipo mesenquimal. Arslan e colaboradores (2007) demonstraram uma correlação positiva

entre o aumento de TGF- β 2 a expressão das isoformas V0 e V1 de versicam em células de glioma. Estudos bloqueando a ação de TGF- β 2 observaram efeitos inibitórios na migração dessas células. Interessantemente, quando utilizaram um anticorpo específico para a região DPEAAE de VCAN, foi possível reverter os efeitos do TGF- β 2 na migração das células de glioma de maneira dose-dependente, demonstrando que o versicam desempenha um importante papel na migração em células de glioma. Desse modo, a ausência de TGF- β 2 no grupo silenciado para VCAN, parece corroborar a intrínseca interação entre ambos na regulação da motilidade e TEM.

DaSilva-Arnold e colaboradores (2019) descreveram que a superexpressão de ZEB2 resulta em aumento de TEM e de invasão em células trofoblásticas Bewo e JEG-3. No entanto, diferentemente da literatura, nossos experimentos mostraram o oposto, com a expressão de mRNA para ZEB2 aumentada no grupo de células silenciadas. No entanto, a expressão de mRNA para ZEB2 pode indicar que outro fator de transcrição pode estar envolvido nessa regulação da diferenciação de células HTR-8SVneo. ZEB2 é um dos fatores descritos como influenciador da diferenciação de CTB em EVT, juntamente com SNAI1, SNAI2, TWIST1 e ZEB1 (Comijn *et al.*, 2001). De maneira mais específica, a expressão de ZEB2 está envolvida com a capacidade invasiva de células EVT, sendo 200 vezes mais expresso em células EVT do primeiro trimestre, em comparação com o CTB no mesmo período gestacional (Da Silva-Arnold *et al.*, 2015). Em contraponto, no terceiro trimestre, os níveis de ZEB2 são reduzidos, refletindo a diminuição do poder de invasão dessas células (Da Silva-Arnold *et al.*, 2018). No contexto do presente trabalho, a expressão de mRNA de ZEB2 ainda não confirma a tradução desse fator para que seja, de fato atuante na ativação de TEM, e em conjunto com mudanças significativas em outras moléculas envolvidas nesse processo de diferenciação (tais como Snail e vimentina), sugere que ZEB2 não atua como fator regulador da TEM em células HTR-8/SVneo.

Prosseguindo com a avaliação de TEM, avaliamos também marcadores proteicos da mesma. A E-caderina aumentou nas células silenciadas, com mais intensidade nas regiões próximas ao núcleo. A associação entre a expressão de VCAN e E-caderina foi feita anteriormente por Zhai e colaboradores (2021), que em células de câncer gástrico mostraram o mesmo que nosso grupo. Em células trofoblásticas, DaSilva-Arnold e colaboradores (2018) demonstraram regulação

negativa da expressão de E-caderina à invasão de células EVT. Da mesma forma, Duzyj e colaboradores (2015) associaram a baixa expressão de E-caderina ao fenótipo invasivo de células trofoblásticas provenientes de placenta anormalmente invasiva.

Com relação à expressão de β -catenina, observamos que a ausência de VCAN produziu uma mudança no padrão de expressão dessa proteína, se apresentando ativa, intranuclear, nas células silenciadas. Chen e colaboradores (2021b) descreveram o VCAN como uma molécula efetora *downstream* na via de sinalização Wnt/ β -catenina. Na placenta, é conhecido que níveis elevados de E-caderina e β -catenina são encontrados em células do citotrofoblasto viloso, enquanto a redução dessa expressão acontece após diferenciação *in vitro* (Getsios *et al.*, 2000). Lickert e colaboradores (2000) descreveram que o aumento da fosforilação de E-caderina aumenta sua afinidade com β -catenina, ademais, a concentração de β -catenina no citoplasma atua na manutenção das características epiteliais das células. Já a proteína Snail apresentou-se fortemente reduzida nas células silenciadas. Zhang e colaboradores (2019) mostraram que Snail induz a expressão da enzima PAPSS2 e de VCAN, aumentando a migração de células neoplásicas de mama. Sendo Snail uma molécula ligada ao fenótipo mais mesenquimal, nossos resultados evidenciam o papel do VCAN na regulação da TEM, promovendo um fenótipo mais mesenquimal quando presente e, mais epitelial quando ausente.

Quanto a citoqueratina e vimentina, observamos que as células silenciadas reduzem fortemente a expressão de vimentina, sem afetar a expressão de citoqueratina. A citoqueratina é reconhecidamente um marcador para células do citotrofoblasto (Wehrum *et al.*, 2011) e células HTR-8/SVneo expressam vimentina e citoqueratina constitutivamente (Straszewski-Chavez *et al.*, 2009). Ademais Wehrum e colaboradores (2011) observaram que, em amostras de placenta anormalmente invasiva, células trofoblásticas extravilosas invasivas apresentaram também um padrão de coexpressão de citoqueratina e vimentina, dados que sugerem um fenótipo semelhante entre as células invasivas da doença com as células usadas aqui como modelo.

Os resultados demonstrados no presente trabalho, corroboram a hipótese inicial de que o versican atua como uma molécula que possui um papel modulador essencial para a motilidade, sinalização AKT e IRF e capacidade de invasão, assim como

desempenha um papel significativo na organização e elasticidade de membrana celular e interfere na expressão de marcadores de TEM de células trofoblásticas da linhagem HTR-8/SVneo (**Fig. 19**). Em conjunto, estes resultados propõem o silenciamento gênico de versican como um interessante alvo terapêutico para patologias placentárias que tem como principal agente de progressão a migração e invasão de células trofoblásticas.

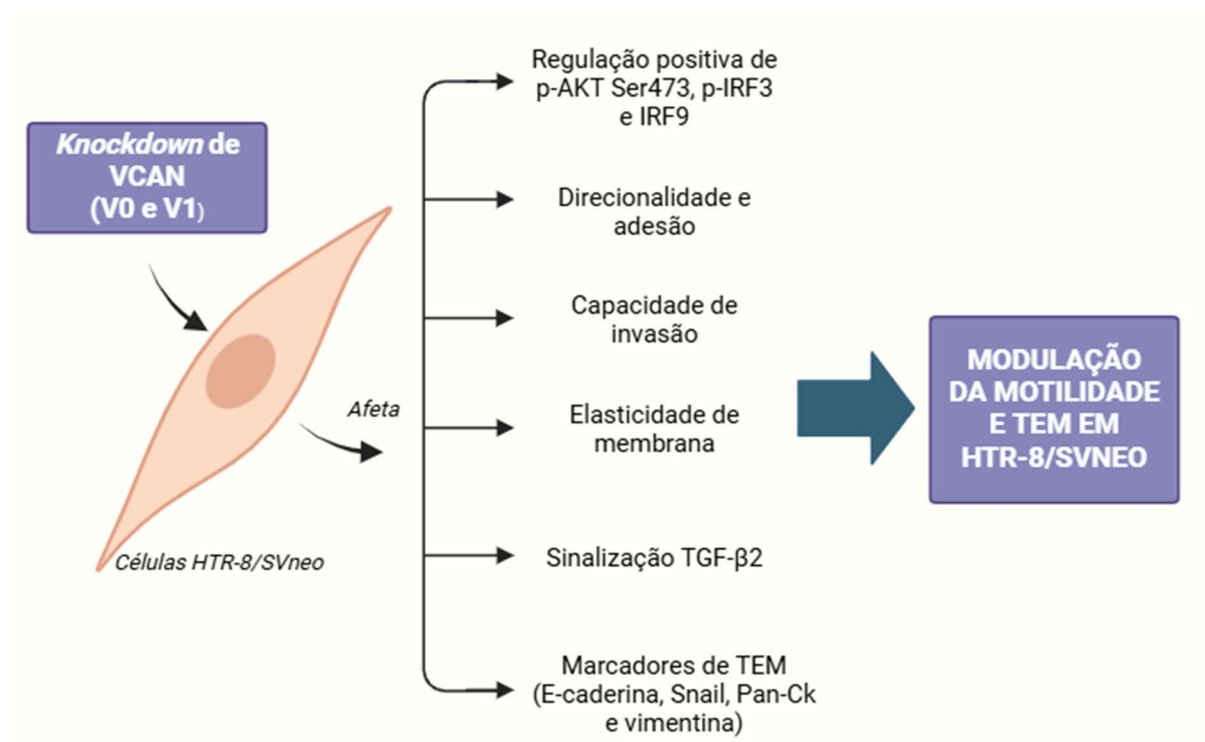


Figura 19. Esquema representativo dos componentes celulares afetados pelo silenciamento gênico de VCAN em células trofoblásticas da linhagem HTR-8/SVneo.

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos por meio do presente trabalho, é possível concluir que:

1. A técnica de siRNA, para *knockdown* de versicam em células HTR-8/SVneo, é eficaz até 72h pós transfecção;
2. O silenciamento gênico de versicam é capaz de alterar a sinalização de p-AKT Ser473, p-IRF3 e IRF9 em células HTR-8SVneo;
3. O silenciamento gênico de versicam altera o padrão de direcionalidade e adesão de células HTR-8/Svneo;
4. O silenciamento gênico de versicam diminui a elasticidade de membrana plasmática e altera a morfologia e altura de células HTR-8/SVneo;
5. O *knockdown* de versicam diminui a capacidade de invasão de células HTR-8/SVneo através de *coating* de Matrigel e células endoteliais Ea.hy926;
6. O *knockdown* de versicam altera a expressão de TGF- β 2 e diferentes marcadores de TEM, tais como E-caderina, Snail, Pan-citoqueratina e vimentina, em células HTR-8/SVneo, sugerindo, dessa forma que este proteoglicano é molécula capaz de regular significativamente a assinatura molecular de TEM e motilidade em células trofoblásticas.

REFERÊNCIAS

- ACLOQUE, H. et al. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. **The journal of clinical investigation**, v. 119, n. 6, p. 1438–1449, 2009.
- ALARCON, V. B.; MARIKAWA, Y. Trophoblast formation: regulation of morphogenesis and gene expressions by RHO, ROCK, cell polarity, and HIPPO signaling. **Reproduction**, v. 164, n. 4, p. R75–R86, 2022.
- ARAKAZA, A.; ZOU, L.; ZHU, J. Placenta accreta spectrum diagnosis challenges and controversies in current obstetrics: A review. **International journal of women's health**, v. 15, p. 635–654, 2023.
- ARSLAN, F. et al. The role of versican isoforms V0/V1 in glioma migration mediated by transforming growth factor- β 2. **British journal of cancer**, v. 96, n. 10, p. 1560–1568, 2007.
- BABALOLA, O. et al. The role of microRNAs in skin fibrosis. **Archives of dermatological research**, v. 305, n. 9, p. 763–776, 2013.
- BARRIERE, G. et al. Epithelial Mesenchymal Transition: a double-edged sword. **Clinical and translational medicine**, v. 4, n. 1, 2015.
- BINDER, M. J. et al. The extracellular matrix in cancer progression: Role of hyaluronate proteoglycans and ADAMTS enzymes. **Cancer letters**, v. 385, p. 55–64, 2017.
- BIRBRAIR, A. (ED.). **Tumor microenvironment: Extracellular matrix components - part A**. 1. ed. Cham, Switzerland: Springer Nature, 2020.
- BOGEN, O. et al. Expression of a novel versican variant in dorsal root ganglia from spared nerve injury rats. **Molecular pain**, v. 15, p. 174480691987455, 2019.
- BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 786-801, 21 nov. 2014.
- BRACKEN, C. P.; GOODALL, G. J. The many regulators of epithelial–mesenchymal transition. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 23, n. 2, p. 89–90, 2022.
- BRUNN, D. et al. Interferon regulatory factor 9 promotes lung cancer progression via regulation of versican. **Cancers**, v. 13, n. 2, p. 208, 2021.
- BUSCH, S. et al. mTOR mediates human trophoblast invasion through regulation of matrix-remodeling enzymes and is associated with serine phosphorylation of STAT3. **Experimental cell research**, v. 315, n. 10, p. 1724–1733, 2009.

- BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 218, n. 2, p. S745–S761, 2018.
- CAI, Z. et al. Vascular extracellular matrix remodeling and hypertension. **Antioxidants & redox signaling**, v. 34, n. 10, p. 765–783, 2021.
- CARTHY, J. M. et al. Versican localizes to the nucleus in proliferating mesenchymal cells. **Cardiovascular Pathology**, Volume 24, Issue 6, 368 – 374, 2015.
- CARTWRIGHT, J. E.; TSE, W. K.; WHITLEY, G. S. Hepatocyte growth factor induced human trophoblast motility involves phosphatidylinositol-3-kinase, mitogen-activated protein kinase, and inducible nitric oxide synthase. **Experimental cell research**, v. 279, n. 2, p. 219–226, 2002.
- CHANG, W. et al. Plasma versican and plasma exosomal versican as potential diagnostic markers for non-small cell lung cancer. **Respiratory research**, v. 24, n. 1, 2023.
- CHEN, H. et al. Promoting effects of MiR-135b on human multiple myeloma cells via regulation of the Wnt/ β -catenin/Versican signaling pathway. **Cytokine**, v. 142, n. 155495, p. 155495, 2021b.
- CHEN, H. et al. The role of circular RNA circ_0008285 in gestational diabetes mellitus by regulating the biological functions of trophoblasts. **Biological research**, v. 54, n. 1, 2021a.
- CHENG, Y. et al. VUp-regulation of VCAN promotes the proliferation, invasion and migration and serves as a biomarker in gastric cancer. **OncoTargets and therapy**, v. 13, p. 8665–8675, 2020.
- CHOUDHURY, J. et al. Epigenetic regulation of epithelial to mesenchymal transition: a trophoblast perspective. **Molecular human reproduction**, v. 28, n. 5, 2022.
- COELHO, B. P. et al. Multifaceted WNT signaling at the Crossroads between epithelial-mesenchymal transition and autophagy in glioblastoma. **Frontiers in oncology**, v. 10, 2020.
- CRITCHER, M.; HUANG, M. L. Excavating proteoglycan structure-function relationships: modern approaches to capture the interactions of ancient biomolecules. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 323, n. 2, p. C415–C422, 2022.
- DA SILVA-ARNOLD, S. C. et al. Human trophoblast epithelial-mesenchymal transition in abnormally invasive placenta. **Biology of reproduction**, v. 99, n. 2, p. 409–421, 2018.

DA SILVA-ARNOLD, S. C. et al. ZEB2, a master regulator of the epithelial–mesenchymal transition, mediates trophoblast differentiation. **Molecular human reproduction**, v. 25, n. 2, p. 61–75, 2019.

DA SILVA-ARNOLD, S. et al. Differentiation of first trimester cytotrophoblast to extravillous trophoblast involves an epithelial–mesenchymal transition. **Placenta**, v. 36, n. 12, p. 1412–1418, 2015.

DEB, G. et al. Matrix proteoglycans in tumor inflammation and immunity. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 323, n. 3, p. C678–C693, 2022.

DEBNATH, P. et al. Epithelial–mesenchymal transition and its transcription factors. **Bioscience reports**, v. 42, n. 1, 2022.

DHALIWAL, D.; SHEPHERD, T. G. Molecular and cellular mechanisms controlling integrin-mediated cell adhesion and tumor progression in ovarian cancer metastasis: a review. **Clinical & experimental metastasis**, v. 39, n. 2, p. 291–301, 2022.

DHAR, R. MTiness in pseudo-malignant behavior of trophoblasts during embryo implantation. **Frontiers in bioscience**, v. 26, n. 4, p. 717–743, 2021.

DOHERTY, M. R. et al. Interferon-beta represses cancer stem cell properties in triple-negative breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 52, p. 13792–13797, 2017.

DOS REIS, D. C. et al. Versican and tumor-associated macrophages promotes tumor progression and metastasis in canine and Murine models of breast carcinoma. **Frontiers in oncology**, v. 9, 2019.

DU, W. W. et al. The role of versican in modulating breast cancer cell self-renewal. **Molecular cancer research: MCR**, v. 11, n. 5, p. 443–455, 2013a.

DU, W. W.; YANG, W.; YEE, A. J. Roles of versican in cancer biology--tumorigenesis, progression and metastasis. **Histology and histopathology**, v. 28, n. 6, p. 701–713, 2013b.

DUZYJ, C. M. et al. The invasive phenotype of placenta accreta extravillous trophoblasts associates with loss of E-cadherin. **Placenta**, v. 36, n. 6, p. 645–651, 2015.

ELANGO, J. et al. The molecular interaction of collagen with cell receptors for biological function. **Polymers**, v. 14, n. 5, p. 876, 2022.

ELLERT-MIKLASZEWSKA, A. et al. Integrin signaling in glioma pathogenesis: From biology to therapy. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 3, p. 888, 2020.

FONTANIL, T. et al. Hyaluronidase activities by the ADAMTS metalloproteases. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 6, p. 2988, 2021.

GAO, D. et al. Microenvironmental regulation of epithelial–mesenchymal transitions in cancer. **Cancer research**, v. 72, n. 19, p. 4883–4889, 2012a.

GAO, D. et al. Myeloid progenitor cells in the premetastatic lung promote metastases by inducing mesenchymal to epithelial transition. **Cancer research**, v. 72, n. 6, p. 1384–1394, 2012b.

GAO, H. et al. The expression of versican and its role in pancreatic neuroendocrine tumors. **et al [Pancreatology]**, v. 20, n. 1, p. 142–147, 2020.

GARRIDO-GÓMEZ, T. et al. Decidualization resistance in the origin of preeclampsia. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 226, n. 2, p. S886–S894, 2022.

GETSIOS, S.; CHEN, G.; MACCALMAN, C. Regulation of beta-catenin mRNA and protein levels in human villous cytotrophoblasts undergoing aggregation and fusion in vitro: correlation with E-cadherin expression. **Reproduction**, v. 119, n. 1, p. 59–68, 2000.

GONÇALVES, C.M. Análise Funcional do Silenciamento Gênico de Versicam em Células Trofoblásticas e sua Implicação em Doenças Gestacionais. **Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)** – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas. Alagoas, p. 103. 2019.

GÓRECKI, I.; RAK, B. The role of microRNAs in epithelial to mesenchymal transition and cancers; focusing on mir-200 family. **Cancer treatment and research communications**, v. 28, n. 100385, p. 100385, 2021.

GOULIOUMIS, A.; GYFTOPOULOS, K. Epithelial-to-mesenchymal transition in metastasis: Focus on laryngeal carcinoma. **Biomedicines**, v. 10, n. 9, p. 2148, 2022.

GUPTA, N. et al. Versican and its associated molecules: potential diagnostic markers for multiple myeloma. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, v. 442, p. 119–124, 2015.

GUPTA, N. et al. Targeting of stromal versican by miR-144/199 inhibits multiple myeloma by downregulating FAK/STAT3 signalling. *RNA biology*, v. 17, n. 1, p. 98–111, 2020.

HARTEN, I. A. et al. The synthesis and secretion of versican isoform V3 by mammalian cells: A role for N-linked glycosylation. **Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 89, p. 27–42, 2020.

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**, v. 6, 2015.

HASHEM, H. Epithelial mesenchymal transition and tissue healing. **Journal of Medical Histology**, v. 2, n. 2, p. 81–102, 2019.

- HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; RAMKUMAR, N.; ANDERSON, K. V. p120-catenin regulates WNT signaling and EMT in the mouse embryo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 34, p. 16872–16881, 2019.
- HIRANI, P. et al. Targeting versican as a potential immunotherapeutic strategy in the treatment of cancer. **Frontiers in oncology**, v. 11, 2021.
- HUANG, R. Y.-J.; GUILFORD, P.; THIERY, J. P. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. **Journal of cell science**, v. 125, n. 19, p. 4417–4422, 2012.
- HO, T.; MSALLAM, R. Tissues and tumor microenvironment (TME) in 3D: Models to shed light on immunosuppression in cancer. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 4, p. 831, 2021.
- ILLSLEY, N. P. et al. Trophoblast invasion: Lessons from abnormally invasive placenta (placenta accreta). **Placenta**, v. 102, p. 61–66, 2020.
- IOZZO, R. V.; SANDERSON, R. D. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 5, p. 1013-1031, maio 2011.
- IOZZO, R.V.; SCHAEFER, L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biology*, v. 42, p. 11-55, mar. 2015.
- ISLAM, S. et al. Accumulation of versican and lack of versikine ameliorate acute colitis. **Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 107, p. 59–76, 2022.
- ISLAM, S.; WATANABE, H. Versican: A dynamic regulator of the extracellular matrix. **The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society**, v. 68, n. 11, p. 763–775, 2020.
- ITOH, T.; TSUJITA, K. Exploring membrane mechanics: The role of membrane-cortex attachment in cell dynamics. **Current opinion in cell biology**, v. 81, n. 102173, p. 102173, 2023.
- JACINTO, E. et al. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates akt phosphorylation and substrate specificity. **Cell**, v. 127, n. 1, p. 125–137, 2006.
- JAMAL EDDIN, T. M. et al. Helicobacter pylori and epithelial mesenchymal transition in human gastric cancers: An update of the literature. **Heliyon**, v. 9, n. 8, p. e18945, 2023.
- JAUNIAUX, E.; KINGDOM, J. C.; SILVER, R. M. A comparison of recent guidelines in the diagnosis and management of placenta accreta spectrum disorders. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 72, p. 102–116, 2021.

JOHAN, M. Z.; SAMUEL, M. S. Rho–ROCK signaling regulates tumor-microenvironment interactions. **Biochemical Society transactions**, v. 47, n. 1, p. 101–108, 2019.

JOSHI, S. et al. Extracellular matrix: A regenerative conduit in dentistry. **IP international journal of periodontology and implantology**, v. 8, n. 2, p. 65–70, 2023.

KAI, F.; DRAIN, A. P.; WEAVER, V. M. The Extracellular Matrix Modulates the Metastatic Journey. **Developmental Cell**, v. 49, n. 3, p. 332–346, maio 2019.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The journal of clinical investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420–1428, 2009.

KARAGIORGOU, Z. et al. Proteoglycans determine the dynamic landscape of EMT and cancer cell stemness. **Cancers**, v. 14, n. 21, p. 5328, 2022.

KARAMANOS, N. K. *et al.* A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. **The FEBS Journal**, 23 mar. 2021.

KEIRE, P. A. et al. Inhibition of versican expression by siRNA facilitates tropoelastin synthesis and elastic fiber formation by human SK-LMS-1 leiomyosarcoma smooth muscle cells in vitro and in vivo. **Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 50, p. 67–81, 2016.

KEIRE, P. A. et al. A Role for Versican in the Development of Leiomyosarcoma. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 49, p. 34089–34103, 15 out. 2014.

KERN, C. B. et al. Proteolytic cleavage of versican during cardiac cushion morphogenesis. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 235, n. 8, p. 2238–2247, 2006.

KERN, C. B. et al. Versican proteolysis mediates myocardial regression during outflow tract development. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 236, n. 3, p. 671–683, 2007.

KIM, J. et al. EGF induces epithelial-mesenchymal transition through phospho-Smad2/3-Snail signaling pathway in breast cancer cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 51, p. 85021–85032, 2016.

KIM, D. et al. Epithelial mesenchymal transition in embryonic development, tissue repair and cancer: A comprehensive overview. **Journal of clinical medicine**, v. 7, n. 1, p. 1, 2017.

KIM, Y. et al. Integrin $\alpha 3 \beta 1$ –dependent β -catenin phosphorylation links epithelial Smad signaling to cell contacts. **The journal of cell biology**, v. 184, n. 2, p. 309–322, 2009.

KIRKPATRICK, C. A.; SELLECK, S. B. Heparan sulfate proteoglycans at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 11, p. 1829-1832, 1 jun. 2007.

KISCHEL, P. et al. Versican overexpression in human breast cancer lesions: Known and new isoforms for stromal tumor targeting. *International Journal of Cancer*, v. 126, n. 3, p. 640-650, 1 fev. 2010.

KNÖFLER, M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. **The International journal of developmental biology**, v. 54, n. 2-3, p. 269-280, 2010.

KORPETINO, A. *et al.* Serglycin: At the Crossroad of Inflammation and Malignancy. **Frontiers in Oncology**, v. 3, 2014.

KWON, J.-Y. et al. Relevance of placental type I interferon beta regulation for pregnancy success. **Cellular & molecular immunology**, v. 15, n. 12, p. 1010-1026, 2018.

KYUNO, D. et al. Role of tight junctions in the epithelial-to-mesenchymal transition of cancer cells. **Biochimica et biophysica acta. Biomembranes**, v. 1863, n. 3, p. 183503, 2021.

LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging biological principles of metastasis. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 670-691, 2017.

LAMOUILLE, S. et al. Regulation of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions by microRNAs. **Current opinion in cell biology**, v. 25, n. 2, p. 200-207, 2013.

LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 3, p. 178-196, 2014.

LAWLESS, L. et al. Trophoblast differentiation: Mechanisms and implications for pregnancy complications. **Nutrients**, v. 15, n. 16, p. 3564, 2023.

LEE, D. H.; OH, Jang-Hee; CHUNG, J. H. Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging. **Journal of Dermatological Science**, v. 83, n. 3, p. 174-181, set. 2016.

LEE, S.-J. et al. Fractalkine stimulates angiogenesis by activating the Raf-1/MEK/ERK- and PI3K/Akt/eNOS-dependent signal pathways. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 291, n. 6, p. H2836-H2846, 2006.

LEHEMBRE, F. et al. NCAM-induced focal adhesion assembly: a functional switch upon loss of E-cadherin. **The EMBO journal**, v. 27, n. 19, p. 2603-2615, 2008.

LI, R. et al. miR-543 impairs cell proliferation, migration, and invasion in breast cancer by suppressing VCAN. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 570, p. 191–198, 2021.

LICKERT, H. et al. Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/ β -catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion. **The journal of biological chemistry**, v. 275, n. 7, p. 5090–5095, 2000.

LIM, J.; THIERY, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. **Development (Cambridge, England)**, v. 139, n. 19, p. 3471–3486, 2012.

LIU, W. et al. Identifying a novel IRF3/circUHRF1/miR-1306-5p/ARL4C axis in pancreatic ductal adenocarcinoma progression. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 21, n. 4, p. 392–405, 2022.

LIU, W.; SUN, T.; WANG, Y. Integrin $\alpha\beta 6$ mediates epithelial-mesenchymal transition in human bronchial epithelial cells induced by lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* via TGF- $\beta 1$ -Smad2/3 signaling pathway. **Folia microbiologica**, v. 65, n. 2, p. 329–338, 2020.

MA, C. et al. Rce1 suppresses invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma via epithelial-mesenchymal transition induced by the TGF- $\beta 1$ /H-Ras signaling pathway. **Journal of cellular physiology**, v. 235, n. 3, p. 2506–2520, 2020.

MANFIOLETTI, G.; FEDELE, M. Epithelial–mesenchymal transition (EMT) 2021. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 10, p. 5848, 2022.

MARCONI, G. D. et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): The type-2 EMT in wound healing, tissue regeneration and organ fibrosis. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 7, p. 1587, 2021.

MCNALLY, L. et al. Up-regulated cytotrophoblast DOCK4 contributes to over-invasion in placenta accreta spectrum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 27, p. 15852–15861, 2020.

MERRY, C. L. R. et al. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. **Essentials of Glycobiology**, edited by Ajit Varki et. al., 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022.pp. 217–232.

MIQUEL-SERRA, L. et al. V3 versican isoform expression has a dual role in human melanoma tumor growth and metastasis. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 86, n. 9, p. 889–901, 2006.

MISE, N. et al. Zyxin is a transforming growth factor- β (TGF- β)/Smad3 target gene that regulates lung cancer cell motility via integrin $\alpha 5 \beta 1$. **The journal of biological chemistry**, v. 287, n. 37, p. 31393–31405, 2012.

MIYAZAKI, Y. et al. Versican V1 in human endometrial epithelial cells promotes BeWo spheroid adhesion in vitro. **Reproduction**, p. 53–64, 2019.

MONTENEGRO, C. F. et al. Inhibition of $\alpha\beta 3$ integrin induces loss of cell directionality of oral squamous carcinoma cells (OSCC). **PloS one**, v. 12, n. 4, p. e0176226, 2017.

NA, T.-Y. et al. The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 11, p. 5931–5937, 2020.

NALLANTHIGHAL, S.; HEISERMAN, J. P.; CHEON, D.-J. The role of the extracellular matrix in cancer stemness. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 7, 2019.

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**, v. 35, p. 34–41, 2014.

NGUYEN, M.; PANITCH, A. Proteoglycans and proteoglycan mimetics for tissue engineering. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 322, n. 4, p. C754–C761, 2022.

NIETO, M. A. Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives. **The International journal of developmental biology**, v. 53, n. 8-9-10, p. 1541–1547, 2009.

NILAND, S.; RISCANEVO, A. X.; EBLE, J. A. Matrix metalloproteinases shape the tumor microenvironment in cancer progression. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 1, p. 146, 2021.

NISTICO, P.; BISSELL, M. J.; RADISKY, D. C. Epithelial-mesenchymal transition: General principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 2, p. a011908–a011908, 2012.

NOBORN, F.; LARSON, G. Characterization of *C. elegans* chondroitin proteoglycans and their large functional and structural heterogeneity; Evolutionary aspects on structural differences between humans and the nematode. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 155–170.

NORONHA, C. et al. Cadherin expression and EMT: A focus on gliomas. **Biomedicines**, v. 9, n. 10, p. 1328, 2021.

OKTEM, G. et al. Cancer stem cell differentiation: TGF β 1 and versican may trigger molecules for the organization of tumor spheroids. **Oncology reports**, v. 32, n. 2, p. 641–649, 2014.

PAN, G. et al. EMT-associated microRNAs and their roles in cancer stemness and drug resistance. **Cancer communications (London, England)**, v. 41, n. 3, p. 199–217, 2021.

PAPADAS, A. et al. Versican and versican-matrikines in cancer progression, inflammation, and immunity. **The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society**, v. 68, n. 12, p. 871–885, 2020.

PAPADAS, A. et al. **Stromal remodeling regulates dendritic cell abundance and activity in the tumor microenvironment**. 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/2021.11.10.467836>>.

PARUCHURI, S. et al. Human pulmonary valve progenitor cells exhibit endothelial/mesenchymal plasticity in response to vascular endothelial growth factor-A and transforming growth factor- β 2. **Circulation research**, v. 99, n. 8, p. 861–869, 2006.

PING, Q. et al. TGF- β 1 dominates stromal fibroblast-mediated EMT via the FAP/VCAN axis in bladder cancer cells. **Journal of translational medicine**, v. 21, n. 1, 2023.

PIRES, K. S. N. et al. Versican silencing in BeWo cells and its implication in gestational trophoblastic diseases. **Histochemistry and cell biology**, v. 151, n. 4, p. 305–313, 2019.

POTENTA, S.; ZEISBERG, E.; KALLURI, R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. **British journal of cancer**, v. 99, n. 9, p. 1375–1379, 2008.

PRAST, J. et al. Human chorionic gonadotropin stimulates trophoblast invasion through extracellularly regulated kinase and AKT signaling. **Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 979–987, 2008.

QIU, Q. et al. Role of pro-IGF-II processing by proprotein convertase 4 in human placental development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 31, p. 11047–11052, 2005.

RAHIMI, M. et al. An integrated analysis to predict micro-RNAs targeting both stemness and metastasis in breast cancer stem cells. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 23, n. 4, p. 2442–2456, 2019.

RICCIARDELLI, C. et al. Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix by prostate cancer cells promotes cell motility. **The 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 metastasis reviews**, v. 28, n. 1–2, p. 233–245, 2009.

ROEDIG, H. et al. Danger matrix molecules orchestrate CD14/CD44 signaling in cancer development. **Seminars in cancer biology**, v. 62, p. 31–47, 2020.

ROONEY, N. et al. The integrin-mediated ILK-Parvin- α Pix signaling axis controls differentiation in mammary epithelial cells. **Journal of cellular physiology**, v. 231, n. 11, p. 2408–2417, 2016.

ROZARIO, T.; DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. **Developmental Biology**, v. 341, n. 1, p. 126-140, maio 2010.

SAGAE, Y. et al. Versican provides the provisional matrix for uterine spiral artery dilation and fetal growth. **Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 115, p. 16–31, 2023.

SAINIO, A.; JÄRVELÄINEN, H. Extracellular matrix-cell interactions: Focus on therapeutic applications. **Cellular signalling**, v. 66, n. 109487, p. 109487, 2020.

SAN MARTIN, S. et al. Small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) in uterine tissues during pregnancy in mice. **Reproduction**, v. 125, n. 4, p. 585–595, 2003.

SAY, L. et al. Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis. **The Lancet. Global health**, v. 2, n. 6, p. e323–e333, 2014.

SERRA, M. et al. V3 versican isoform expression alters the phenotype of melanoma cells and their tumorigenic potential. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 114, n. 6, p. 879–886, 2005.

SHANKER, S. A. et al. Placenta accreta spectrum: biomarker discovery using plasma proteomics. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 223, n. 3, p. 433.e1-433.e14, 2020.

SHANG, S.; HUA, F.; HU, Z.-W. The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. **Oncotarget**, v. 8, n. 20, p. 33972–33989, 2017.

SHANKAR, J.; NABI, I. R. Actin cytoskeleton regulation of epithelial mesenchymal transition in metastatic cancer cells. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0119954, 2015.

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

SHUKLA, S. et al. Synthesis and organization of hyaluronan and versican by embryonic stem cells undergoing embryoid body differentiation. **The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society**, v. 58, n. 4, p. 345–358, 2010.

SOLES, A. et al. Extracellular matrix regulation in physiology and in brain disease. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 8, p. 7049, 2023.

SOMMARIVA, M.; GAGLIANO, N. E-cadherin in pancreatic ductal adenocarcinoma: A multifaceted actor during EMT. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 4, p. 1040, 2020.

SONDEREGGER, S. et al. Wingless (Wnt)-3A induces trophoblast migration and matrix metalloproteinase-2 secretion through canonical Wnt signaling and protein kinase B/AKT activation. **Endocrinology**, v. 151, n. 1, p. 211–220, 2010.

SONG, Y.; ZHANG, F.; LINHARDT, R. J. Analysis of the glycosaminoglycan chains of proteoglycans. **The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society**, v. 69, n. 2, p. 121–135, 2021.

SOTOODEHNEJADNEMATALAHI, F., & BURKE, B. Structure, Function and Regulation of Versican: The Most Abundant Type of Proteoglycan in the Extracellular Matrix. **In Acta Medica Iranica**, 2013. (Vol. 51, Issue 11).

STRASZEWSKI-CHAVEZ, S. L. et al. The isolation and characterization of a novel telomerase immortalized first trimester trophoblast cell line, swan 71. **Placenta**, v. 30, n. 11, p. 939–948, 2009.

SUN, C. et al. Functions of exogenous FGF signals in regulation of fibroblast to myofibroblast differentiation and extracellular matrix protein expression. **Open biology**, v. 12, n. 9, 2022.

SUN, F.; WANG, S.; DU, M. Functional regulation of decidual macrophages during pregnancy. **Journal of reproductive immunology**, v. 143, n. 103264, p. 103264, 2021.

TAMBORINDEGUY, M. T. et al. Asymmetric mitosis contributes to different migratory performance in sister cells. **Experimental cell research**, v. 430, n. 1, p. 113715, 2023.

TANG, F. et al. Defining the versican interactome in lung health and disease. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 323, n. 2, p. C249–C276, 2022.

TANTBIROJN, P.; CRUM, C. P.; PARAST, M. M. Pathophysiology of placenta Creta: The role of decidua and extravillous trophoblast. **Placenta**, v. 29, n. 7, p. 639–645, 2008.

THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced drug delivery reviews**, v. 97, p. 4–27, 2016.

TIMMS, K. P.; MAURICE, S. B. Context-dependent bioactivity of versican fragments. **Glycobiology**, v. 30, n. 6, p. 365–373, 2020.

VARBERG, K. M.; SOARES, M. J. Paradigms for investigating invasive trophoblast cell development and contributions to uterine spiral artery remodeling. **Placenta**, v. 113, p. 48–56, 2021.

VENNIN, C. et al. Targeting ROCK activity to disrupt and prime pancreatic cancer for chemotherapy. **Small GTPases**, v. 11, n. 1, p. 45–52, 2020.

- WALKER, C.; MOJARES, E.; DEL RÍO HERNÁNDEZ, A. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, p. 3028, 4 out. 2018.
- WALLACE, A. E.; FRASER, R.; CARTWRIGHT, J. E. Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership. **Human reproduction update**, v. 18, n. 4, p. 458–471, 2012.
- WANG, H.; MI, K. Emerging roles of endoplasmic reticulum stress in the cellular plasticity of cancer cells. **Frontiers in oncology**, v. 13, 2023.
- WANG, M. et al. Paclitaxel-resistant gastric cancer MGC-803 cells promote epithelial-to-mesenchymal transition and chemoresistance in paclitaxel-sensitive cells via exosomal delivery of miR-155-5p. **International journal of oncology**, 2018.
- WANG, X.; EICHHORN, P. J. A.; THIERY, J. P. TGF- β , EMT, and resistance to anti-cancer treatment. **Seminars in cancer biology**, v. 97, p. 1–11, 2023.
- 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.
- WATANABE, H. Aggrecan and versican: two brothers close or apart. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 322, n. 5, p. C967–C976, 2022.
- WATANABE, H. Versican and versikine: The dynamism of the extracellular matrix. **Proteoglycan Research**, v. 1, n. 4, 2023.
- WEHRENDT, D. P. et al. P120-catenin regulates early trafficking stages of the N-cadherin precursor complex. **PloS one**, v. 11, n. 6, p. e0156758, 2016.
- WEHRUM, M. J. et al. Accreta complicating complete placenta previa is characterized by reduced systemic levels of vascular endothelial growth factor and by epithelial-to-mesenchymal transition of the invasive trophoblast. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 204, n. 5, p. 411.e1-411.e11, 2011.
- WEI, T. et al. Interleukin-17A promotes tongue squamous cell carcinoma metastasis through activating miR-23b/versican pathway. **Oncotarget**, v. 8, n. 4, p. 6663–6680, 2017.
- WENG, J. et al. Amiodarone induces epithelial-mesenchymal transition in A549 cells via activation of TGF- β 1. **Drug and chemical toxicology**, v. 43, n. 4, p. 415–422, 2020.
- WERFEL, J. et al. How changes in extracellular matrix mechanics and gene expression variability might combine to drive cancer progression. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e76122, 2013.

WIGHT, T. N. et al. V3: an enigmatic isoform of the proteoglycan versican. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 325, n. 2, p. C519–C537, 2023.

WIGHT, T. N. et al. Versican and the regulation of cell phenotype in disease. **Biochimica et biophysica acta. General subjects**, v. 1840, n. 8, p. 2441–2451, 2014.

WIGHT, T. N. et al. Versican—A critical extracellular matrix regulator of immunity and inflammation. **Frontiers in immunology**, v. 11, 2020.

WIGHT, T. N. Provisional matrix: A role for versican and hyaluronan. **Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 60–61, p. 38–56, 2017.

WITTE, D. et al. Negative regulation of TGF- β 1-induced MKK6-p38 and MEK-ERK signalling and epithelial-mesenchymal transition by Rac1b. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, 2017.

WONG, S. H. M. et al. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 121, p. 11–22, 2018.

XIE, Y.-G. et al. FYN promotes breast cancer progression through epithelial-mesenchymal transition. **Oncology reports**, v. 36, n. 2, p. 1000–1006, 2016.

YANG, H.; WANG, L. Heparan sulfate proteoglycans in cancer: Pathogenesis and therapeutic potential. In: **Advances in Cancer Research**. [s.l.] Elsevier, 2023. p. 251–291.

YIN, S.-Y. et al. The phytochemical shikonin stimulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) in skin wound healing. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, v. 2013, p. 1–13, 2013.

ZEISBERG, E. M. et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. **Nature medicine**, v. 13, n. 8, p. 952–961, 2007.

ZEISBERG, M.; SHAH, A. A.; KALLURI, R. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. **The journal of biological chemistry**, v. 280, n. 9, p. 8094–8100, 2005.

ZHAI, L. et al. Overexpressed versican promoted cell multiplication, migration and invasion in gastric cancer. **Tissue & cell**, v. 73, n. 101611, p. 101611, 2021.

ZHANG, P. Decidual vasculopathy and spiral artery remodeling revisited II: relations to trophoblastic dependent and independent vascular transformation. **The journal of maternal-fetal & neonatal medicine: the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians**, v. 35, n. 2, p. 395–401, 2022.

ZHANG, Q. et al. Upregulation of versican associated with tumor progression, metastasis, and poor prognosis in bladder carcinoma. **BioMed research international**, v. 2021, p. 1–11, 2021.

ZHANG, X. et al. SALL4 activates TGF- β /SMAD signaling pathway to induce EMT and promote gastric cancer metastasis. **Cancer management and research**, v. 10, p. 4459–4470, 2018.

ZHANG, Y. et al. Enhanced PAPSS2/VCAN sulfation axis is essential for Snail-mediated breast cancer cell migration and metastasis. **Cell death and differentiation**, v. 26, n. 3, p. 565–579, 2019.

ZHANG, Y.; LIU, Z.; SUN, H. Fetal-maternal interactions during pregnancy: a ‘three-in-one’ perspective. **Frontiers in immunology**, v. 14, 2023.

ZHANG, Y.; WEINBERG, R. A. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. **Frontiers of medicine**, v. 12, n. 4, p. 361–373, 2018.

ZHANGYUAN, G. et al. VersicanV1 promotes proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma through the activation of EGFR–PI3K–AKT pathway. **Oncogene**, v. 39, n. 6, p. 1213–1230, 2020.

ZHENG, F. et al. The putative tumour suppressor microRNA-124 modulates hepatocellular carcinoma cell aggressiveness by repressing ROCK2 and EZH2. **Gut**, v. 61, n. 2, p. 278–289, 2012.

ZHENG, H. et al. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1 α /CXCR4 via PI3K/akt/eNOS signal transduction pathway. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 50, n. 3, p. 274–280, 2007.

ZHOU, J. et al. Uterine damage induces placenta accreta and immune imbalance at the maternal-fetal interface in the mouse. **Placenta**, v. 119, p. 8–16, 2022.