



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

DANIEL ANDRES OSORIO RODRIGUEZ

EFEITO DA MATRIZ EXTRACELULAR NAS CÉLULAS
MUSCULARES LISAS PROSTÁTICAS IN VITRO

CAMPINAS

2019

DANIEL ANDRES OSORIO RODRIGUEZ

**EFEITO DA MATRIZ EXTRACELULAR NAS CÉLULAS
MUSCULARES LISAS PROSTÁTICAS IN VITRO**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do Título de doutor em Biologia
Celular e Estrutural, na área de Biologia
Celular.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO DANIEL ANDRÉS OSORIO RODRÍGUEZ
E ORIENTADA PELO PROF. DR. HERNANDES
FAUSTINO DE CARVALHO.

Orientador: HERNANDES FAUSTINO DE CARVALHO

Co-Orientador: ALINE MARA DOS SANTOS

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Os5e Osorio Rodríguez, Daniel Andrés, 1986-
Efeito da matriz extracelular nas células musculares lisas prostática *in vitro*
/ Daniel Andrés Osorio Rodríguez. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Hernandes Faustino Carvalho.
Coorientador: Aline Mara dos Santos.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Próstata. 2. Miócitos de músculo liso. 3. Proteína-tirosina quinases de
adesão focal. 4. Matriz extracelular. I. Carvalho, Hernandes Faustino de, 1965-.
II. Santos, Aline Mara dos, 1982-. III. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effect of extracellular matrix in prostatic smooth muscle cells *in vitro*

Palavras-chave em inglês:

Prostate
Myocytes, Smooth muscle
Focal adhesion protein-tyrosine kinases
Extracellular matrix

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Hernandes Faustino Carvalho [Orientador]

Manoel Francisco Biancardi

Cristina Pontes Vicente

Sérgio Luis Felisbino

Luís Antonio Justulin Junior

Data de defesa: 20-09-2019

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-5026-8441>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2030080856125312>

Campinas, 20 de setembro de 2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente

Dr. Manoel Francisco Biancardi

Dr. Sérgio Luis Felisbino

Dr. Luis Antonio Justulin Junior

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedicatória

Dedico este trabalho à memória de Victor Manuel Rodríguez, meu avô, que me apoiou em todos os momentos em que estive entre nós. Agradeço pelos seus conselhos, valores, motivação constante e, sobretudo, pelo seu amor com todos seus filhos e netos.

Agradecimentos

Principalmente a Deus pela sabedoria e fortaleza que me concede em todos os momentos.

A toda minha família que, apesar da distância, sempre estiveram comigo em todas as situações. Especialmente aos meus pais Daniel E. Osorio C. e Luz Dary Rodríguez S., meu tio Eduardo Rodríguez, minhas irmãs Ángela e Sara, meus sobrinhos Camilo, Isabella e Joel, que sempre me alentaram durante este longo caminho.

Ao Professor Dr. Hernandes F. Carvalho, por abrir as portas do seu laboratório para desenvolver essa pesquisa. Lhe agradeço por ter mudado minha forma de pensar, por seus ensinamentos e por me mostrar o quanto eu sou capaz de ir longe.

À Professora Dra. Fernanda Cristina Alcantara dos Santos e ao Professor Dr. Manoel Francisco Biancardi, pela amizade e ajuda que me brindaram durante meu tempo no Brasil.

À Professora Dra. Aline dos Santos, pela sua amizade, paciência, colaboração e assessoria neste trabalho.

A Ariane Tocci, pela sua amizade e grande ajuda em todos os processos de documentação desde o início até o final do curso.

Ao Professor Dr. Silvio Consonni, pelo suporte técnico na microscopia eletrônica.

Ao Professor Dr. Murilo Geraldo e ao Antônio Felix da Silva Filho, pela assessoria com o RT-PCR.

À Isabella Barbutti, Aline Siqueira e Tone Vander, companheiros do laboratório e aos demais colegas do doutorado com os que compartilhei várias experiências.

À Dra. Mariana Ozello Baratti, técnica do INFABIC. Fico honrado pela oportunidade de ter conhecido você e sua maravilhosa família. Você é um exemplo de generosidade, bondade, carinho e compreensão. Muito obrigado pela sua amizade, pelos bons momentos e ajuda na microscopia confocal.

Ao Rony Nunes, meu grande amigo, pelas contribuições técnicas e os diversos aprendizados que tivemos juntos.

À Dra. Maraysa de Oliveira Melo, pelas suas correções e assessorias no trabalho.

Ao Francisco Breno S. Teófilo, pelos seus aportes na revisão do documento.

Ao Júlio Santana, Guilherme Barbosa e Rafaela da Rosa-Ribeiro, pela sua hospitalidade no início do doutorado.

Ao Dr. Danilo Ferrucci, à Dra. Juliana Aparecida Godoy e à Dra. Silvia Pimentel por sua amizade e ensinamentos durante o doutorado.

Ao Dr. Victor Pelagati, técnico do INFABIC, pelo suporte na microscopia confocal.

Aos técnicos do laboratório Leandro Cardoso e James William do Couto, pelo suporte e colaboração.

Ao pessoal da engenharia química, Naiara Godoi, Francielle Vit, João Batista e Gabriel Silveira pela sua amizade e ajuda em vários processos durante o doutorado.

Aos meus amigos Wagner e Rose Fonseca, Adriano Diniz, Daniel Seabra, Darlan e Aveline Bonetti, César e Nathalie Castelo, Felipe Trigueiro e Karen Galvão que estiveram comigo nas alegrias e dificuldades. Com eles compartilhei e guardo os bons momentos que desfrutei em Campinas.

Aos professores do Instituto de Biologia que me colaboraram com assessorias, materiais e reagentes quando precisei.

A Lilian Panagio, ex-secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pelas informações, atenção e suporte prestados.

À FAPESP, pelo incentivo através da bolsa e auxílios à pesquisa (Processos: 2015/03235-4 e 2009/16150-6) que possibilitaram a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós. ”

ANTOINE DE SAINT-EXUPÉRY

Resumo

A próstata é uma glândula acessória do trato reprodutor masculino responsável pela produção e armazenamento do líquido prostático. Esta glândula é alvo de várias afecções como prostatite, hiperplasia e câncer, doenças que comprometem a saúde e bem-estar do homem e são responsáveis por grande número de mortes. A nível histológico podem ser identificados três compartimentos nesta glândula: o epitélio, o lúmen e o estroma. As células musculares lisas (CMLs) são o principal componente do estroma e apresentam uma modulação fenotípica dependendo de diferentes fatores, sendo que um deles é a matriz extracelular (MEC). Neste trabalho avaliamos o efeito de diferentes componentes de MEC (colágeno, fibrina e Matrigel) na adesão, morfologia, fenótipo e localização da quinase de adesão focal (FAK) nas CMLs de próstata. Os resultados preliminares nos levaram estudar a adesão das células no colágeno e o posterior bloqueio das proteínas Rho GTPases. Por último, estudamos o efeito do TGF α e TGF β na migração celular. Os resultados mostram que o colágeno favorece uma rápida adesão das CMLs, que fibrina é degradada na presença destas e que no Matrigel elas se agrupam. No colágeno, o citoesqueleto de actina se organiza em grandes fibras de estresse, que não são observadas na fibrina nem no Matrigel. A FAK apresentou uma localização nuclear nas células semeadas no colágeno. Na fibrina e no Matrigel a marcação nuclear estava ausente e sua distribuição no citoplasma estava em forma de agregados. A forma fosforilada da FAK na tirosina 925 apresenta uma maior co-localização com a cadeia pesada da miosina (MYH11) no colágeno. As CMLs na fibrina e no Matrigel apresentaram diminuição nos marcadores do fenótipo contrátil, sugerindo que esses componentes de MEC favorecem o fenótipo sintético. Enquanto aos efeitos da inibição das proteínas Rho GTPases na adesão das CMLs sobre o colágeno, Rac1, Rac3 e Cdc42 são importantes para a adesão das células, enquanto a inibição de ROCK não inibiu a adesão das CMLs ao colágeno e, posteriormente, permitiu a migração – evento que não acontecia quando as CMLs estavam somente sobre o colágeno. A exposição ao inibidor de ROCK nas CMLs desencadeou alterações na morfologia celular, no citoesqueleto de actina, na distribuição de α -actinina e na diminuição da expressão de SM-actina e MYH11. Finalmente observamos que o TGF α estimula a migração das CMLs, mesmo em concentrações baixas. Os resultados aqui apresentados demonstram que a MEC influencia o comportamento e o fenótipo das CMLs de próstata. As GTPases Rac e Cdc42 são importantes para a adesão das células enquanto que ROCK tem efeito na manutenção do fenótipo contrátil.

Abstract

The prostate is an accessory gland of the male reproductive tract and is responsible for the production and storage of prostate fluid. This gland is affected by numerous diseases such as prostatitis, hyperplasia and cancer. These diseases compromise men's health and well being and are responsible for a large number of deaths, worsening with the advanced age. At histological level three compartments can be identified: epithelium, lumen and stroma. Smooth muscle cells (SMCs) are the main component of the stroma and showing a phenotypic modulation depending on different factors, one of them being the extracellular matrix (ECM). In this work we evaluated the effect of different components of ECM (collagen, fibrin and Matrigel) on adhesion, morphology, phenotype and focal adhesion kinase (FAK) localization in prostate SMCs. Preliminary results led us to study cell adhesion in collagen and subsequent blockade of Rho GTPases proteins. Finally, we study the effect of TGF α and TGF β on cell migration. The results show that collagen promote a fast adhesion of SMCs, whereas, fibrin is degraded by the cells and that on Matrigel they formed cell clusters. In collagen, the actin cytoskeleton organizes into large stress fibers, which are not observed in fibrin or Matrigel. FAK had a nuclear localization in the cells seeded on collagen. On fibrin and Matrigel nuclear labeling was absent and its distribution in the cytoplasm was in as aggregates. The phosphorylated form of FAK on tyrosine 925 shows a greater co-location with the myosin heavy chain (MYH11) on collagen. SMCs on fibrin and Matrigel decreased markers of contractile phenotype, suggesting that these components of ECM favor the synthetic phenotype. The effects of inhibition of Rho GTPases proteins on the adhesion of CMLs on collagen, Rac1, Rac3 and Cdc42 are important for cell adhesion, while ROCK inhibition did not inhibit adhesion of SMCs to collagen and subsequently allowed migration - an event that did not happen when SMCs were only on collagen. Exposure to ROCK inhibitor triggered changes in cell morphology, actin cytoskeleton, α -actinin distribution, and decreased expression of SM-actin and MYH11. Finally, we observed that TGF α stimulates the migration of CMLs, even at low concentrations. The results presented here demonstrate that ECM influences the behavior and phenotype of prostate CMLs. Rac and Cdc42 GTPases are important for cell adhesion while ROCK has an effect on the maintenance of contractile phenotype.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACTA2: Gene que expressa a proteína SM-actina.

BSA: Albumina de soro bovino. Do inglês: *Bovine Serum Albumin*

Cdc42: Proteína membro da família Rho que liga GTP. Do inglês: *Cell division control protein 42 homolog*

CML: Célula Muscular Lisa

CMLv: Célula Muscular Lisa vascular

DMEM: Meio Eagle modificado por Dulbecco

EPM: Erro padrão da média

FAK: Quinase de adesão focal. Do inglês: *Focal adhesion kinase*

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

LPA: Ácido lisofosfatídico

MEC: Matriz Extracelular

MLC: Cadeia leve da miosina

MYH: Cadeia pesada da miosina

PBS: Salina tamponada com fosfato

PFA: Paraformaldeído

Rac: Proteína membro da família Rho que liga GTP. Do inglês: *Ras-related C3 botulinum toxin substrate*

Ras: Superfamília de proteínas monoméricas que ligam GTP. Do inglês: *Rat sarcoma*

Rho: Família de proteínas Ras. Do inglês: *Ras homologous*

RhoA: Proteína membro da família Rho que liga GTP

ROCK: Proteína quinase ativada por RhoA. Do inglês: *Rho-associated protein kinase*

SBF: Soro fetal bovino

SM-actina: Alfa actina de músculo liso

TGF- α : Fator de crescimento transformante alfa

TGF- β : Fator de crescimento transformante beta

TRITC: Isotiocianato de tetrametilrodamina

Sumario

1	Introdução	17
1.1	Aspectos Gerais da Próstata	17
1.2	A Célula Muscular Lisa (CML)	18
1.2	Efeito da Castração Sobre as Células Prostáticas	19
1.4	A Matriz Extracelular (MEC)	22
1.5	A Quinase de Adesão Focal (FAK)	23
1.6	Rho GTPases.....	25
2.	Hipótese	28
3.	Objetivos.....	28
3.1	Geral.....	28
3.2	Específicos	28
4.	Capítulos	29
	CAPÍTULO I.....	30
	Influência de diferentes componentes de MEC nas CMLs	30
1.	Material e métodos.....	30
1.1	Animais e alimentação.....	30
1.2	Obtenção das CMLs da Próstata Ventral de Ratos Wistar	31
1.3	Obtenção de colágeno tipo I a partir da cauda de rato.....	31
1.4	SDS-PAGE do colágeno obtido	32
1.5	Cultura de CMLs sobre componentes de MEC	32
1.6	Degradação de fibrina fluorescente	33
1.7	Imunofluorescência	33
1.8	Microscopia eletrônica de CMLs sobre componentes de MEC	34
1.9	Western blotting (WB)	34
1.10	Real Time - PCR	35
1.10	Análises de imagens	36

1.11 Análises estatísticas	36
2. Resultados	37
2.1 Obtenção de CMLs a partir de explantes de próstata ventral de rato	37
2.2 Obtenção de colágeno tipo I a partir da cauda de rato.....	37
2.3 Influência dos componentes de MEC na adesão, espalhamento e morfologia das CMLs	38
2.4 Influência dos componentes de MEC no comportamento e organização do citoesqueleto de actina nas CMLs	41
2.5 Influência dos componentes de MEC no fenótipo das CMLs	43
3. Discussão	45
4. Conclusões	48
CAPÍTULO II.....	49
Quinase de adesão focal (FAK) e sua distribuição nas CMLs	49
1. Material e métodos.....	49
1.1 Cultura e imunofluorescência de CMLs sobre componentes de MEC.....	49
1.2 Análises de imagens	50
2. Resultados	51
2.1 Localização de FAK total e co-localização com componentes do citoesqueleto após 48h	51
2.2 Localização de FAKpY397 e co-localização com componentes do citoesqueleto após 48h	52
2.3 Localização de FAKpY925 e interação com componentes do citoesqueleto após 48h	54
3. Discussão	57
4. Conclusões	58
CAPÍTULO III	59
Importância das Rho GTPases para adesão e espalhamento das CMLs no colágeno	59
1. Material e métodos.....	59

1.1 Cultura e imunofluorescência de CMLs.....	59
1.2 Marcação com Faloidina-TRITC e DAPI	60
1.3 Western blotting	60
1.4 Real Time - PCR	61
1.5 Efeito de inibidores da família Rho na adesão das CMLs.....	62
1.6 Teste de migração (<i>wound healing assay</i>) nas CMLs	62
1.7 Análises de imagens	62
1.8 Análises estatísticas	63
2. Resultados	64
2.1 Efeito do colágeno na morfologia das CMLs após 48 h em cultura.....	64
2.2 FAK nas CMLs.....	65
2.3 Inibição de ROCK, Rac e Cdc42 nas CMLs semeadas sobre o colágeno tipo I	66
2.4 Organização do Citoesqueleto e Espalhamento.....	68
2.5 Adesões focais	69
2.5 Marcadores do fenótipo contrátil nas CMLs	71
2.6 Trajetória de Migração	72
2.7 Teste de Migração (<i>wound healing assay</i>)	73
3. Discussão	75
4. Conclusões	77
CAPÍTULO IV	78
Efeito do TGF α , do TGF β 1 e do TGF β 3 na migração das CMLs.....	78
1. Material e métodos.....	78
1.1 Teste de migração (<i>wound healing assay</i>) nas CMLs	78
1.2 Análises de imagens	79
1.3 Análises estatísticas	79
2. Resultados.....	80
3. Discussão	83

4. Conclusões	86
5. Referências Bibliográficas.....	87
6. Anexos.....	96
6.1 Termo de aprovação da pesquisa pela Comissão de Bioética.....	96
6.2 Declaração referente a direitos autorais	97

1 Introdução

1.1 Aspectos Gerais da Próstata

A próstata é uma glândula acessória do trato reprodutor masculino, mas não é exclusiva desse gênero, podendo também ser encontrada em fêmeas (Biancardi et al., 2017; Zaviacic and Ablin, 2000). Em machos, ela está localizada ao redor da uretra, próxima à base da bexiga, com função principal de produzir secreções que fornecem nutrientes e mantêm um ambiente adequado para sobrevivência dos espermatozoides (Risbridger and Taylor, 2006). Em humanos, a próstata masculina adulta é dividida em regiões que diferem entre si quanto à predominância de elementos estromais e epiteliais, como também à susceptibilidade de desenvolver lesões como hiperplasia benigna prostática e adenocarcinoma (Selman, 2011). Já em roedores, a próstata é dividida em lobos que apresentam diferenças histológicas e funcionais entre elas, mas com homologia à próstata humana (Ittmann, 2018) (Fig. 1). Embora haja diferenças anatômicas entre a próstata de humanos e roedores, estruturalmente elas são bastantes semelhantes. Ambas são caracterizadas com base em três compartimentos distintos: epitélio, estroma e lúmen. O epitélio pode variar de simples cuboide a pseudoestratificado cilíndrico, contendo células secretoras, basais e neuroendócrinas. O compartimento estromal é composto principalmente de células musculares lisas (CMLs) que estão localizadas imediatamente abaixo da membrana basal do epitélio, fibroblastos, células do sistema imune, células endoteliais e nervosas, além dos componentes fibrosos, como colágenos e fibras elásticas. O lúmen armazena o material produzido pelas células epiteliais secretoras (Ittmann, 2018). As interações entre os compartimentos epitelial e estromal é mediada por fatores parácrinos produzidos tanto pelas células epiteliais quanto pelas estromais e são importantes durante o desenvolvimento, manutenção na vida adulta e patologia prostática. (Cunha and Chung, 1981; Cunha et al., 1996; Prins and Putz, 2008).

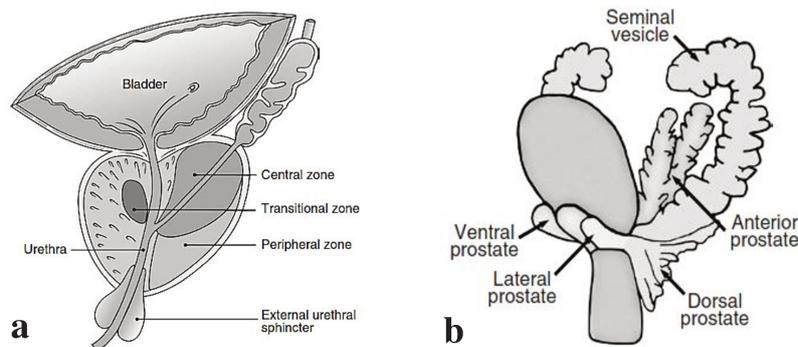


Figura 1. Representação da próstata humana (a) e de roedor (b) apresentando as diferenças anatômicas. A próstata humana (a) é um órgão compacto enquanto que a de roedor é uma estrutura lobulada. Risbridger, G. P. and R. A. Taylor (2006).

1.2 A Célula Muscular Lisa (CML)

Durante o desenvolvimento prostático há uma constante sinalização entre as células estromais e aquelas do epitélio do seio urogenital, aqui são secretados vários fatores que medeiam a comunicação entre esses dois compartimentos. Mediante a ação da testosterona e pelos fatores secretados pelo epitélio, os fibroblastos mesenquimais se diferenciam em células musculares lisas (CMLs) circundam assim os brotos de epitélio (Cunha et al., 1996). No indivíduo adulto, as CMLs são o principal componente celular do estroma prostático, sendo responsável pela contração da glândula durante a ejaculação, além de desempenhar funções importantes; criando um ambiente propício para a manutenção do epitélio, seja em situações normais ou patológicas. Em ratos, as CMLs ocupam 5% do volume total da glândula e cerca de 14% do estroma (Antonioli et al., 2004). As CMLs apresentam uma morfologia fusiforme na próstata, mas seu formato muda dependendo da localização no organismo. Além disso, o comprimento destas é variável, por exemplo, nos vasos sanguíneos de menor calibre elas podem ter 40 μm , enquanto no útero, durante a gestação, podem atingir até 600 μm (Carvalho & Collares-Buzato, 2005).

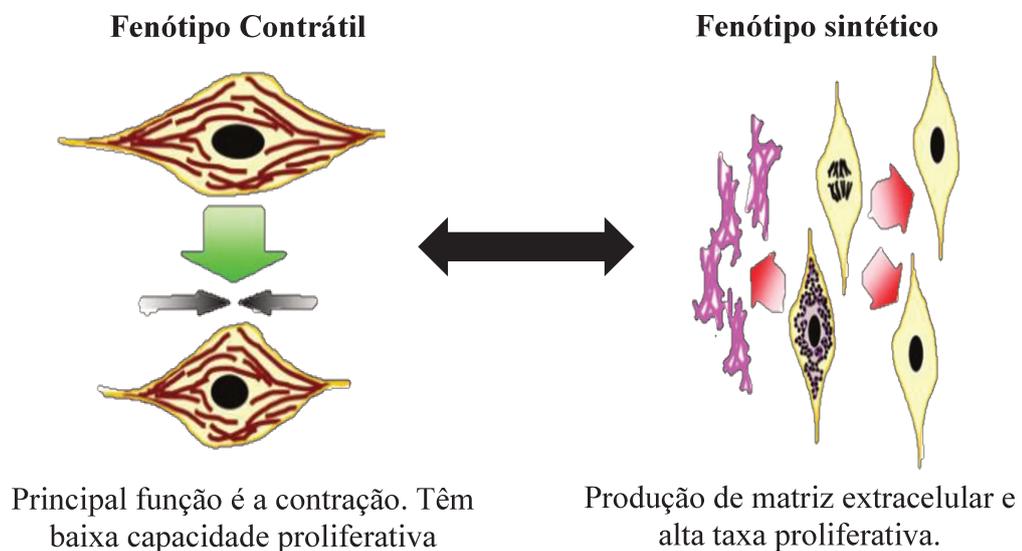


Figura 2. Representação da plasticidade fenotípica das CMLs. As CMLs com fenótipo contrátil são responsivas aos sinais que desencadeiam a contração, apresentam uma alta expressão de proteínas envolvidas no processo de contração e têm baixa taxa de proliferação. Por sua vez, aquelas com fenótipo sintético produzem componentes de matriz extracelular, apresentam uma alta taxa de proliferação e aumento no número e tamanho de organelas envolvidas na secreção. Adaptado de Beamish et al. (2010).

O que mais se conhece sobre CMLs são os trabalhos realizados com células musculares lisas vasculares (CMLv). Tem sido descrito que estas células apresentam uma plasticidade fenotípica (Owens, 1995; Owens et al., 2004) e têm capacidade de modular o seu fenótipo dependendo de situações fisiológicas e patológicas, o que é caracterizado pela mudança na expressão de genes específicos. Essa plasticidade celular permite que as células musculares lisas sejam observadas em duas formas principais: aquelas com fenótipo sintético (secretor e/ou proliferativo) e aquelas com fenótipo contrátil. Acredita-se que essa notável plasticidade é necessária para o crescimento das células e reparo após a lesão, quando funções adicionais como proliferação e secreção são necessárias (Louis and Zahradka, 2010) (Fig. 2). Além disso, hormônios esteroides e citocinas estão envolvidos no controle desta plasticidade (Hong et al., 2004; Leimgruber et al., 2017; Peehl and Sellers, 1997).

Têm sido descritos vários marcadores para as CMLs, os quais estão associados ao fenótipo contrátil e, geralmente, relacionados com a estruturação e funcionamento do aparelho contrátil do músculo liso, como α -actina de músculo liso (SM-actina), SM-calponina, SM22 α , *smoothelin*, h-caldesmona e miocardina (Owens et al., 2004; Rensen et al., 2007). Já as proteínas moesina, gelsolina, profilina e cofilina são predominantes nas CMLs sintéticas (Doevendans and van Eys, 2002).

1.2 Efeito da Castração Sobre as Células Prostáticas

Depois da castração, há uma grande redução do tamanho e peso da próstata. Esta redução é atribuída inicialmente a uma parada na síntese dos produtos de secreção e uma acelerada liberação do conteúdo luminal. Seguem-se a diminuição do tamanho das células epiteliais e a eliminação de um grande número delas por processos como apoptose e descamação, resultando em lóbulos menores formados por um epitélio cúbico baixo (Brandes, 1966; Brandstrom et al., 1994; Hu et al., 1998; Kerr and Searle, 1973; Rosa-Ribeiro et al., 2014).

A diminuição do tamanho e do peso da próstata devido à privação de testosterona é antecedida pela diminuição do fluxo sanguíneo para o tecido prostático (Lekas et al., 1997). As células endoteliais e algumas estromais entram em apoptose 12 horas após a orquiectomia, enquanto as células epiteliais atingem o maior nível de apoptose somente 72 horas depois da cirurgia (Shabisgh et al., 1999). A apoptose das células endoteliais ocorre simultaneamente com algumas mudanças no sistema vascular da glândula, como uma drástica restrição do leito dos

vasos revestidos por uma camada de CMLs (Hayek et al., 1999) e o extravasamento das proteínas do plasma para as regiões periglandulares do tecido (Shabisgh et al., 1999). Como estas alterações do sistema vascular da próstata precede no início da apoptose em células epiteliais, foi sugerido que a diminuição do fluxo sanguíneo seja uma das bases da subsequente perda das células epiteliais e do processo regressivo da próstata induzido pela castração (Hayek et al., 1999; Shabisgh et al., 1999).

Além da morte celular, há remodelação da matriz extracelular (MEC), no qual a membrana basal do epitélio apresenta-se mais dobrada e com aumento no conteúdo de heparan sulfato (de Carvalho and Line, 1996), enquanto no estroma há aumento e remodelação da fibras de colágeno tipo I e III que é atribuída às CMLs (Vilamaior et al., 2000). Há também reorganização das formas moleculares e distribuição do ácido hialurônico (Della-Colleta and Carvalho, 2018).

Durante as mudanças que acontecem na glândula, as CMLs adquirem uma morfologia particular, aparentemente atrófica (Fig. 3), mas ainda com vários marcadores do fenótipo contrátil, como SM-actina e cadeia pesada da miosina de músculo liso (MYH11) (Fig. 4). A ultraestrutura destas células revela uma redução do aparato contrátil e aumento das organelas de secreção (Antonioli et al., 2007; Antonioli et al., 2004; Vilamaior et al., 2005).

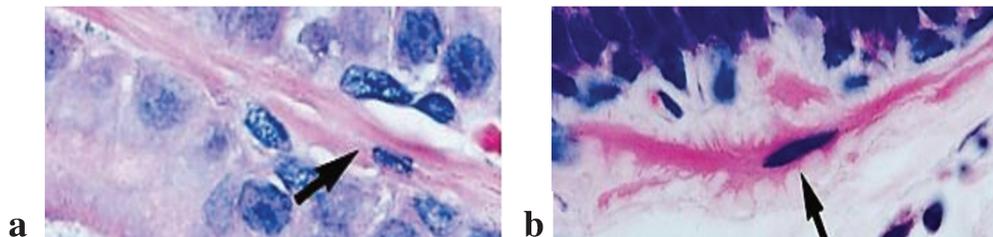


Figura 3. Microfotografia de um corte de próstata ventral de rato corada com hematoxilina e eosina. Controle (a). As CMLs apresentam uma morfologia fusiforme e uma estreita proximidade às células epiteliais. Após 21 dias da orquiectomia (b). As CMLs adquirem uma morfologia mais dendrítica/espínosa. Antonioli et al. (2004).

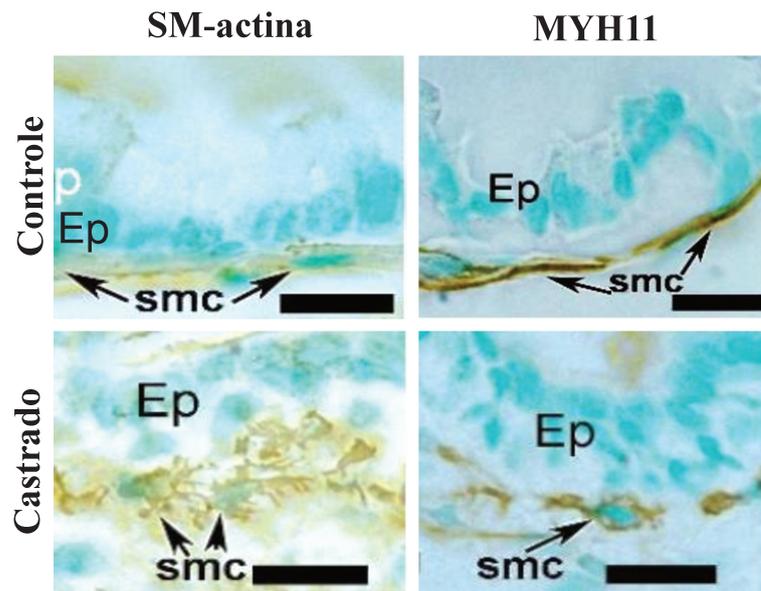


Figura 4. Imuno-histoquímica para SM-actina e MYH11 em cortes de próstata ventral de ratos controle e 100 dias após a castração. As CMLs foram positivas para a marcação de SM-actina e MYH11 nas duas condições. A marcação da MYH11 no grupo castrado esteve predominantemente na região perinuclear. Antonioli et al. (2007). (EP: Epitélio; SMC: Célula muscular lisa).

Seguida à morte das células endoteliais, ocorre extravasamento do plasma que, posteriormente, entra em contato com o fator tissular, presente nas células extravasculares, resultando na ativação dos componentes da cascata de coagulação que leva à formação de uma malha de fibrina (Panteleev et al., 2015) (Fig. 5). O soro, presente como a parte líquida resultante da polimerização da fibrina, contém várias citocinas que estão envolvidas na migração das células. Estudos realizados para compreender o processo de cicatrização na pele têm identificado que fatores presentes no soro como o TGF- α e o TGF- β 3 estão envolvidos na migração das células dérmicas e epidérmicas durante esse processo. O TGF- α promove a migração dos queratinócitos, enquanto o TGF- β 3 inibe a migração dos fibroblastos e das células vasculares endoteliais (Bandyopadhyay et al., 2006; Li et al., 2006).

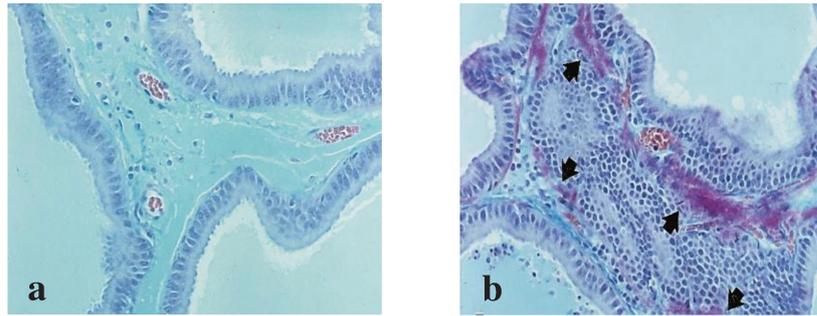


Figura 5. Microfotografias de cortes histológicos da próstata ventral. Em ratos controle (a) e 24 h após a castração (b), corados pela técnica de Fraser-Lendrum. Esta técnica permite a identificação da fibrina formada como resultado da coagulação. Após a castração, nota-se a presença de fibrina no estroma prostático em estreito contato com as CMLs (setas). Shabisgh et al. (1999).

Vários trabalhos demonstraram que o comportamento das CMLs é regulado por TGF- β 1. Em particular, há uma estreita associação entre a expressão de actina de músculo liso e o estímulo por esta citocina, especialmente na transição fibroblasto-miofibroblasto, que acontece nos processos de reparo de feridas e cicatrização (Hautmann et al., 1997). Sugere-se também que o TGF- β 1 é a molécula responsável pela organização das CMLs no eixo próximo-distal da próstata de roedores, com grande concentração nas regiões proximais (Nemeth et al., 1997).

1.4 A Matriz Extracelular (MEC)

A MEC é o componente não celular presente nos tecidos que circunda os diferentes tipos celulares que fazem parte dele. No passado, acreditava-se que a MEC funcionava somente como um suporte físico para as células e tecidos, porém nos últimos anos têm sido identificadas várias funções da MEC relacionadas aos seus componentes, entre elas, que a MEC influencia o comportamento, migração, proliferação, forma e função das células mediante mecanismos de sinalização bioquímica e mecânica durante a morfogênese, diferenciação e homeostase. A MEC também regula a quantidade de fatores de crescimento que podem interagir com seus receptores celulares, nível de água e pH do ambiente local (Frantz et al., 2010; Mouw et al., 2014). Todas essas diversas funções são obtidas pela sua complexa composição e organização (Fig. 6).

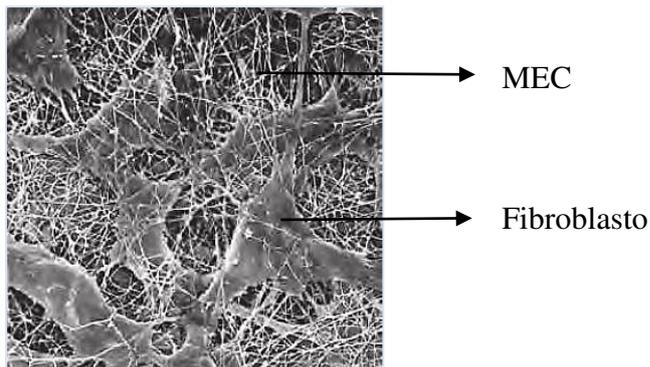


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura de fibroblastos do tecido conjuntivo. Observa-se que a MEC, semelhante a uma rede, está em contato com a superfície das células. Adaptado de Alberts et al. (2015).

A MEC é composta de diferentes proteínas e polissacarídeos que formam complexos macromoleculares estáveis. Esses componentes são localmente secretados pelas células e montados em uma rede organizada com estreita associação à superfície celular. Colágenos, proteoglicanos, glicoproteínas e elastina são os principais tipos de macromoléculas presentes. Cada tipo de tecido tem uma única composição desses elementos que é adquirida durante o desenvolvimento. A comunicação das células com a MEC é mediada através de receptores localizados na superfície da membrana. As duas famílias principais envolvidas nessa comunicação são as integrinas e sindecans (Frantz et al., 2010).

Na próstata, os colágenos estão fazendo parte do estroma e da membrana basal das células epiteliais e musculares. Os tipos de colágeno com maior presença nesta glândula são o tipo I, III e IV. Após a castração e durante a carcinogênese o ambiente prostático é alterado, a MEC sofre remodelação permitindo as células migrarem, também há diferença na expressão das integrinas (de Carvalho and Line, 1996; Nagle, 2004). A principal função do colágeno tipo I é proporcionar resistência à tração, mas não é a única já que também regulam a adesão, proliferação e migração de diferentes tipos celulares (Rozario and DeSimone, 2010; Schor, 1980).

1.5 A Quinase de Adesão Focal (FAK)

A MEC tem a capacidade de modular o comportamento das células, processo que é mediado através da adesão com proteínas transmembrana que atuam como receptores a componentes da MEC. Esses receptores ligam-se aos componentes da MEC no seu domínio extracelular e no domínio intracelular ao citoesqueleto.

As adesões são formadas principalmente pelas células aderentes e apresentam heterogeneidade quanto a sua morfologia, tamanho e distribuição subcelular. Várias dessas adesões compartilham duas características: são mediadas pelas integrinas e interagem com o citoesqueleto de actina no interior da célula. As adesões focais são as mais estudadas, onde medeiam a forte adesão ao substrato e ancoram os feixes de microfilamentos de actina através de placas que contém diferentes tipos de proteínas (Geiger et al., 2001).

As adesões focais são um grupo dinâmico de proteínas estruturais e regulatórias que traduzem os sinais externos para o interior da célula, desencadeando uma resposta efetora para um sinal específico. Entre as proteínas que fazem parte desse grupos estão: a talina, a paxilina, a Src, a p130Cas, a vinculina, a α -actinina e a FAK, entre outras (Mitra et al., 2005) (Fig. 7).

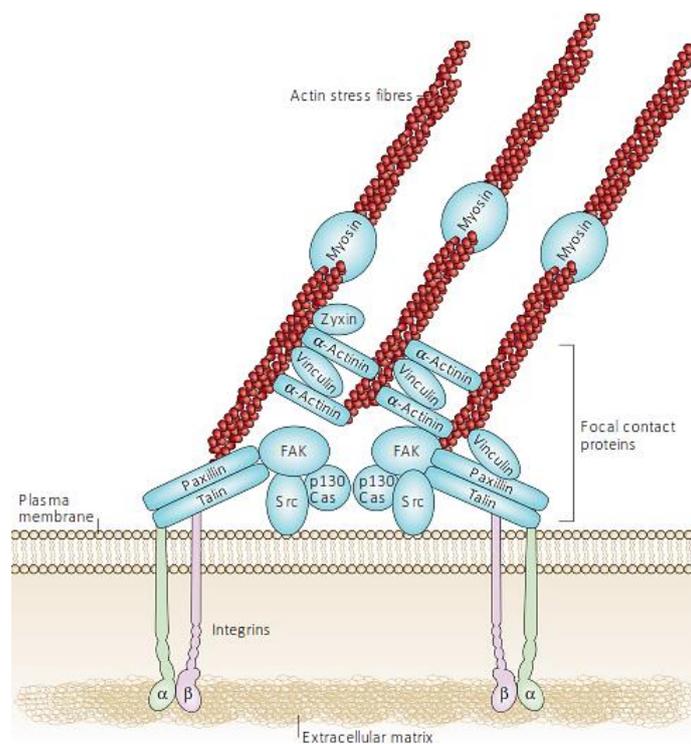


Figura 7. Principais proteínas envolvidas nas adesões focais. As integrinas ligam-se a componentes específicos de MEC do lado extracelular, enquanto que no seu domínio citoplasmático elas interagem com proteínas que estabilizam a adesão e comunicam a MEC com o citoesqueleto de actina. Mitra et al. (2005).

A FAK é uma enzima associada às adesões focais, atuando como elemento integrador das interações entre o citoesqueleto e a matriz extracelular por ser ativada particularmente por integrinas ativadas (ou seja ligadas aos seus ligantes cognatos da matriz extracelular) (Bershadsky et al., 2003; Janmey and McCulloch, 2007; Mitra et al., 2005). A FAK é composta por 4 diferentes domínios: um domínio N-Terminal (FERM), um domínio central com atividade

tirosina quinase, um domínio C-terminal (FAT) e uma região rica em prolina, situada entre o domínio central e o domínio FAT (Schaller, 2010). A FAK responde aos sinais enviados pela MEC e regula processos como proliferação, migração, sinalização célula-célula, sobrevivência, entre outros (Arold, 2011; Mitra et al., 2005). Alterações nesses processos celulares estão associados com o desenvolvimento e progressão de doenças (Schaller, 2010).

O mecanismo de ativação da FAK envolve a interação com outro monômero de FAK. Os monômeros se encontram na sua forma autoinibida na célula. Na autoinibição da FAK, o domínio FERM e o domínio quinase interagem bloqueando a sua autofosforilação na posição Y397. O domínio FERM apresenta uma sequência composta de aminoácidos básicos (KAKTLR) que permite a ligação do fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI-4,5-P₂), essa interação induz mudanças conformacionais na FAK, embora sem uma completa ativação. Além da ligação do (PI-4,5-P₂), há também interação entre os monômeros de FAK através dos seus domínios FERM:FERM e FAT:FAT o que permite a autofosforilação em Y397. Essa interação pode ser aumentada pela proteína paxilina. A fosforilação em Y397 cria um sítio de ligação para Src que fosforila FAK em vários sítios induzindo sua ativação completa terminando a inibição dos domínios FERM e quinase (Kleinschmidt and Schlaepfer, 2017).

Nos cardiomiócitos, a FAK transita entre uma distribuição específica nos costâmeros para uma associação particular com os componentes do sarcômero, estando particularmente relacionada com a hipertrofia cardíaca (Santos et al., 2012). Muito do que se conhece da presença e função da FAK em CMLs refere-se às células musculares lisas vasculares (CMLv). Na próstata, tem sido observado que um aumento da fosforilação da FAK (pY925) o qual está envolvido com a capacidade invasiva das células prostáticas (Senapati et al., 2010). Também, os altos níveis de FAK estão relacionados com a progressão do carcinoma prostático (Rovin et al., 2002). Inibidores da FAK são capazes de reduzir a força de contração do músculo liso, demonstrando participação desta proteína na geração de forças de contração e na sua transmissão dentro do órgão. Neste mesmo trabalho, o estímulo da atividade contrátil com fenilefrina promoveu um aumento na fosforilação da FAK nas Y397 e Y925 (Kunit et al., 2014).

1.6 Rho GTPases

As células respondem a sinais extracelulares através de receptores presentes na membrana plasmática. A resposta a esses estímulos é controlada por proteínas monoméricas da superfamília Ras (Rat sarcoma) que ligam GTP e estão reguladas pelos GEFs (fatores de troca

célula onde participa da maturação das adesões focais, formação de fibras de estresse e contração dos filamentos de actina-miosina (Parsons et al., 2010) (Fig. 9).

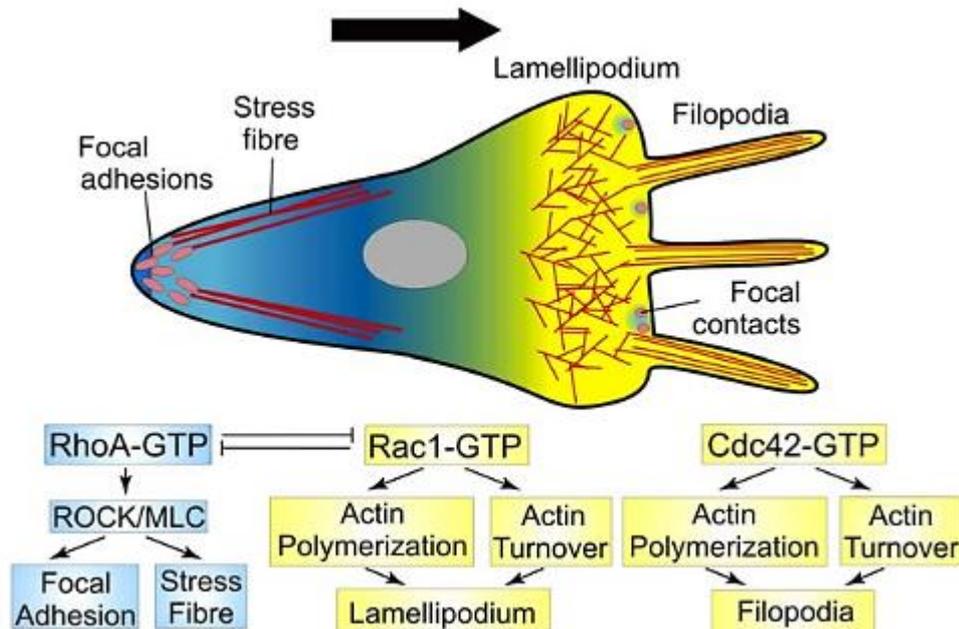


Figura 9. Controle do citoesqueleto pelas Rho GTPases durante a migração celular. RhoA, Rac1 e Cdc42 atuam em diferentes regiões da célula. Na frente de migração, a Rac1 induz a formação de lamelipódios enquanto que o Cdc42 induz a formação de filopódios. RhoA encontra-se na parte traseira da célula controlando a maturação das adesões focais e a formação de fibras de estresse. Adaptado de Mayor, R. and C. Carmona-Fontaine (2010).

Embora tenha sido dada grande importância às relações entre epitélio e estroma na biologia e nas patologias prostáticas (Cunha et al., 1996) e que as CMLs tenham sido implicadas no fenômeno “estroma reativo” (Tuxhorn et al., 2001), pouco tem sido abordado sobre os aspectos de sinalização e comportamento das CMLs em condições isoladas. Neste trabalho exploramos aspectos específicos da sinalização celular, regulação da expressão de componentes do citoesqueleto e interações com a MEC de forma reducionista, mas com grande aprofundamento e detalhamento.

2. Hipótese

A matriz extracelular influencia o fenótipo e comportamento das células musculares lisas de próstata.

3. Objetivos

3.1 Geral

Caracterizar os efeitos de diferentes componentes de matriz extracelular nas células musculares lisas prostáticas *in vitro*.

3.2 Específicos

- Determinar a influência dos diferentes componentes de MEC (colágeno tipo I, fibrina e Matrigel) na adesão, morfologia e expressão de marcadores do fenótipo contrátil em células musculares lisas de explantes de próstata.
- Analisar a localização e ativação da FAK em células musculares lisas de próstata semeadas em diferentes substratos;
- Estudar o efeito da inibição da ROCK, da Rac e da Cdc42 nas células musculares lisas de próstata semeadas sobre colágeno tipo I;
- Avaliar o efeito do TGF α , do TGF β 1 e do TGF β 3 na migração das células musculares lisas de próstata.

4. Capítulos

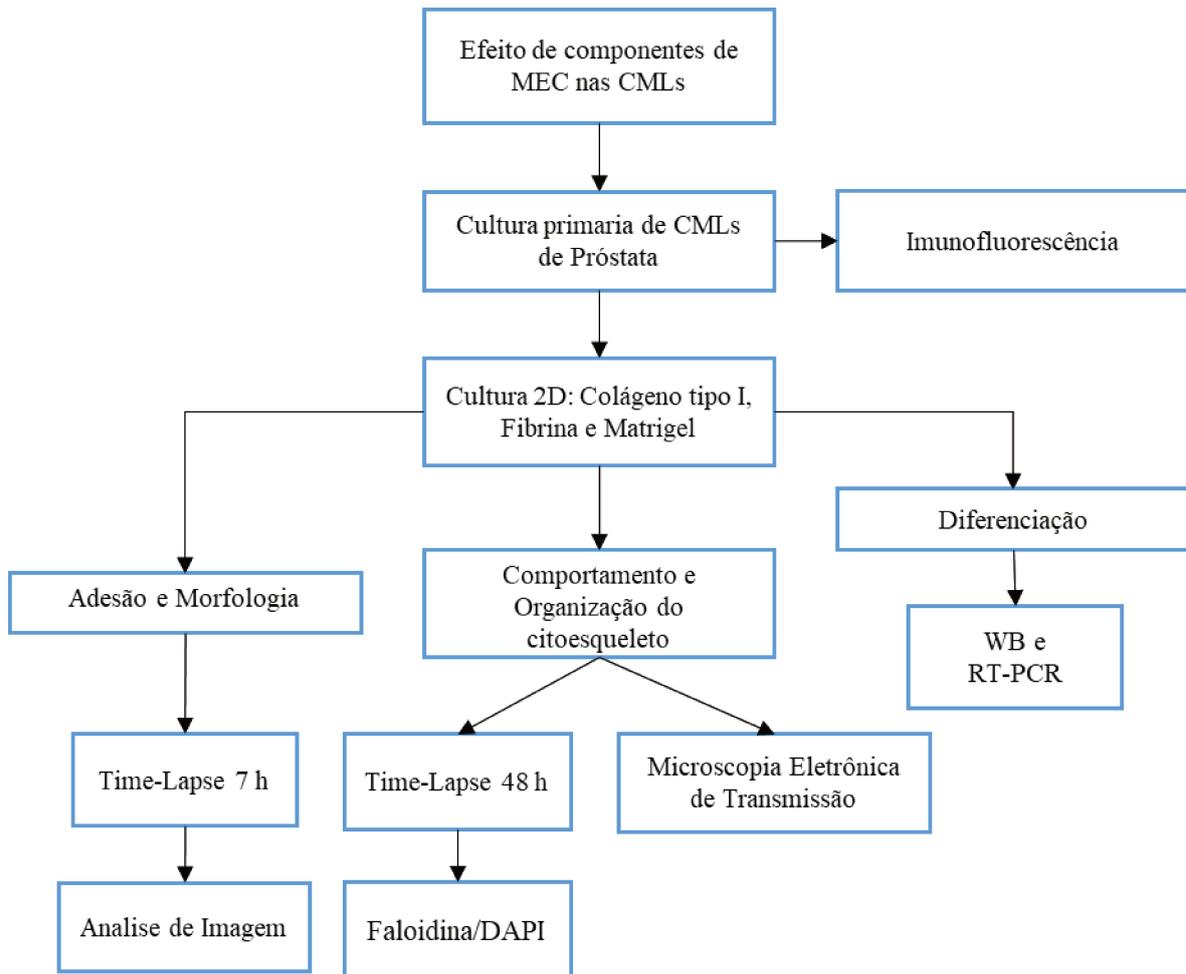
Esta tese está dividida em quatro capítulos, enumerados a seguir:

- I. Influência de diferentes componentes de MEC nas CMLs;
- II. Quinase de adesão focal (FAK) e distribuição nas CMLs;
- III. Importância das Rho GTPases para adesão e espalhamento das CMLs no colágeno;
- IV. Efeito do TGF α , do TGF β 1 e do TGF β 3 na migração das CMLs.

CAPÍTULO I

Influência de diferentes componentes de MEC nas CMLs

Neste capítulo buscamos determinar o efeito de componentes de MEC na adesão, morfologia e grau de diferenciação das CMLs.



Esquema ilustrativo que resume a metodologia utilizada e sua finalidade neste capítulo.

1. Material e métodos

1.1 Animais e alimentação

O protocolo de pesquisa utilizado neste projeto está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), registrado sob número 4132-1. Ratos machos Wistar com 30 dias de idade foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório

(CEMIB) da UNICAMP e mantidos no biotério do IB até a data de eutanásia (8-10 semanas de idade) com água filtrada e ração *ad libitum*.

1.2 Obtenção das CMLs da Próstata Ventral de Ratos Wistar

As CMLs foram obtidas seguindo o procedimento descrito por Gerdes e colaboradores (Gerdes et al., 1996) com algumas modificações. Durante os 4 anos de doutorado foram usados 25 ratos Wistar (8-10 semanas de idade). A próstata ventral (PV) dos animais foi coletada e imersa em solução de PBS (Salina tamponada com fosfato) e antibiótico (penicilina/estreptomicina 2% -Sigma, Cat: P4333-). Posteriormente, em ambiente estéril, a PV foi dissociada mecanicamente em fragmentos de 1-2 mm³ e foram colocados em placas de 24 poços contendo meio de cultura DMEM (Sigma, cat: D1145) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina/estreptomicina 1%, cipionato de testosterona 0,5 µg/mL e de insulina 5 µg/mL (Novolin® N 100 UI/mL). O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. Após atingirem 80% de confluência, as CMLs foram tripsinizadas (Tripsina/EDTA 0.25%, Sigma cat: T4049) e plaqueadas em garrafas de cultura de 25cm² para amplificação do número de células. Os experimentos foram realizados com as CMLs nas passagens 4 até 7, como padronizado em nosso laboratório, as CMLs de explantes de próstata ventral nessas passagens, expressam os marcadores do fenótipo contrátil.

1.3 Obtenção de colágeno tipo I a partir da cauda de rato

As caudas dos animais foram reaproveitadas para a extração de colágeno tipo I. As caudas de rato foram coletadas imediatamente após a eutanásia, submetidas a assepsia em etanol 70%, por 2 h, seguidas de banho em água destilada. Os tendões das caudas foram isolados com auxílio de pinças e colocados em uma solução de ácido acético 3%, por 48 h, a 4°C em agitação. A solução obtida foi centrifugada a 2000g, por 30 min, a 4°C, para a remoção de material insolúvel. Posteriormente, a solução de colágeno obtida foi dialisada em água destilada, por 72 h, a 4°C em agitação. A solução final de colágeno foi liofilizada e armazenada a 4°C até seu uso.

1.4 SDS-PAGE do colágeno obtido

Antes da liofilização, reservou-se uma alíquota da solução de colágeno para confirmar o êxito da extração mediante eletroforese. Para isso, foi preparado um gel de acrilamida/bisacrilamida (10%). A amostra de colágeno foi misturada com tampão de amostra contendo beta-mercaptoetanol e aquecida a 95°C, por 5 min. Após a polimerização dos géis, foram colocados 14 µL da solução colágeno/tampão de amostra em cada poço. O gel foi depositado na cuba com tampão de corrida e deixou-se correr a 80 V por 30 min e, posteriormente a 120 V, por 1.5 h. Após o tempo de corrida, o gel foi corado com solução de Coomassie Blue até a visualização das bandas. Em seguida, o gel foi tratado com solução descolorante (30% Etanol e 10% ácido acético diluídos em água) para conseguir uma melhor definição das bandas. O gel foi preservado numa solução de metanol 30% e glicerol 3% em água.

1.5 Cultura de CMLs sobre componentes de MEC

Foram utilizados os seguintes componentes da MEC: colágeno tipo I, fibrina e Matrigel. Para preparar a matriz de colágeno, 2.5 mg de colágeno liofilizado foram pesados e diluídos em 1 mL de ácido acético 0.34 N. O fundo da placa de 24 poços foi coberto com 100 µL da solução de colágeno. A placa com colágeno foi seca ao ar no fluxo laminar e esterilizada por iluminação com UV. O gel de fibrina foi feito a partir de plasma humano com baixa concentração de plaquetas obtido no Hemocentro da UNICAMP. Para 1 mL de plasma foram adicionados 50 µL de uma solução estéril de CaCl₂ 10%. Em placas de 24 poços, foram colocados 100 µL da solução plasma-CaCl₂ e o gel de fibrina era formado após 25 min a 37°C. Outro substrato utilizado foi o Matrigel reduzido em fatores de crescimento (Geltrex/Gibco, Cat: A14132-02), que contém os principais constituintes da membrana basal das células: colágeno tipo IV e laminina. Na hora de uso, cuidadosamente foram colocados 100 µL dessa matriz no fundo da placa de 24 poços. A placa foi levada à incubadora a 37°C, durante 1 h, tempo no qual o gel foi formado. As CMLs foram semeadas nos diferentes géis e o comportamento delas foi filmado no microscópio invertido por 48 h usando o sistema *time-lapse* do software ZEN (Zeiss). Após esse tempo, as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4%, durante 20 min, lavadas com PBS e marcadas com Faloidina-TRITC e DAPI para a análise morfológica e do citoesqueleto.

Para o estudo de adesão, do espalhamento e da morfologia das células através do tempo, as CMLs foram semeadas sobre os diferentes substratos e filmadas durante 7 h. As medidas foram feitas com intervalo de uma hora no sistema *time-lapse*.

1.6 Degradação de fibrina fluorescente

A degradação da fibrina foi observada por fluorescência, para isso, preparou-se uma solução tampão de bicarbonato-carbonato 1M e pH 10. Posteriormente, 200 mg de gelatina (Sigma, Cat: G8150) foram misturados com 90 mL de água destilada pré-aquecida até dissolver completamente. Em seguida, foram adicionados 10 mL de tampão bicarbonato-carbonato (0,1M). Usou-se como fluoróforo o isotiocianato de fluoresceína (FITC), sendo 1 mg para 100 mL de solução gelatina-tampão. A solução resultante foi dialisada em água destilada, por 24 h, em agitação leve. Por último, a solução gelatina-tampão-FITC foi filtrada por membrana e liofilizada para seu armazenamento.

1.7 Imunofluorescência

Foram semeadas 5000 CMLs/poço (placa de 24 poços) sobre lamínulas de vidro. Após 48 h de cultura, as CMLs foram fixadas com PFA 4% contendo 0,6 % de Triton X-100 e sacarose 4% durante 20 min e lavadas com PBS (3 vezes, por 5 min cada). Posteriormente, foi adicionado PBS-T 0,1% (Tween 20), por 5 min. Após esse tempo, foram realizadas lavagens novamente com PBS (3 vezes, por 5 min cada). O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito com solução de albumina de soro bovino (BSA) 3% diluída em PBS por 1 h, contendo 0,8% de Triton X-100. As células foram então incubadas com anticorpo primário (Tabela 1) *overnight*, a 4°C em câmara úmida. No dia seguinte, foram feitas lavagens com PBS (3 vezes, por 5 min cada) e em seguida realizou-se a incubação com anticorpos secundários específicos (Tabela 1) e DAPI por 1 h, em câmara úmida, no escuro. As imagens foram adquiridas usando o microscópio confocal LSM780 (Carl Zeiss).

Anticorpo Primário	Fabricante/Catálogo	Diluição
SM-actina	Thermo Fisher/MA5-11547	1:100
MYH11	Abcam/ab683	1:200

Anticorpos Secundário	Fabricante/Catálogo	Diluição
Alexa Fluor 488	Invitrogen/ A32723	1:2000
Alexa Fluor 546	Invitrogen/ A11035	1:2000

Tabela 1. Anticorpos primários e secundários usados nos experimentos de imunofluorescência.

1.8 Microscopia eletrônica de CMLs sobre componentes de MEC

CMLs sobre colágeno, fibrina e Matrigel foram mantidas em cultura por 48 h. Após esse tempo, as células foram fixadas com uma solução de tampão fosfato 0,2M, glutaraldeído 5% e sacarose 2%. Em seguida, as amostras foram lavadas no respectivo tampão e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, por 3 h, em temperatura ambiente. Subsequentemente, as células foram desidratadas em séries crescentes de acetona (50 a 100%), infiltradas em soluções de resina/acetona e incluídos em resina Epoxy a 60°C, por 72 h, para polimerização. Os cortes ultrafinos foram realizados em ultramicrotomo LEICA, sendo os mesmos contrastados em soluções de acetato de uranila 2% e citrato de chumbo 0,1%. Posteriormente, os cortes foram posicionados em telas de cobre e microfotografias foram adquiridas no microscópio eletrônico de transmissão LEO 906 do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

1.9 Western blotting (WB)

CMLs foram colocadas sobre os diferentes substratos e, após 48 h de cultura, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS, coletadas e incubadas com tampão RIPA, por 30 min. Posteriormente, o resíduo insolúvel foi removido por centrifugação a 12000 rpm, por 20 min, a 4°C. O conteúdo de proteínas na solução foi quantificado pelo método de Bradford. 50 µg de proteínas foram aplicados em gel de eletroforese (SDS-PAGE). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em sistema úmido da BioRad. Subsequentemente, as membranas foram bloqueadas com BSA 5% em TBS-T e então incubadas com o anticorpo primário para SM-actina e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato

desidrogenase) (Tabela 1) e colocadas *overnight*, a 4°C em agitação. No outro dia, a membrana foi incubada com os anticorpos secundários específicos (Tabela 2). O controle de carregamento do gel foi determinado pela quantidade de GAPDH. A detecção da proteína foi feita por quimioluminescência usando o kit de revelação da Santa Cruz Biotechnology (SC-2048).

Anticorpo Primário	Fabricante/Catálogo	Diluição
SM-actina	Thermo Fisher/MA5-11547	1:1000
GAPDH	Abcam/ab9485	1:1000

Anticorpos Secundário	Fabricante/Catálogo	Diluição
Anti-camundongo	Bio-Rad/1706516	1:5000
Anti-coelho	Bio-Rad/1706515	1:5000

Tabela 2. Anticorpos primários e secundários usados nos experimentos de WB.

1.10 Real Time - PCR

O RNA foi extraído usando o reagente TRIzol (Life Technologies, Cat:15596018) seguindo as recomendações do fabricante. Foram semeadas 20000 células/poço (placa de 24 poços) e, após 48 h de cultura, foi adicionado o TRIzol (400 µL/poço). O RNA foi separado com clorofórmio (200 µL para cada 1000 µL de TRIzol) e precipitado com Isopropanol absoluto (500µL para cada 1000µL de TRIzol). Uma etapa de lavagem foi realizada usando Etanol 75% e, finalmente, o RNA foi ressuspendido em 15 µL de água DEPC. O RNA foi quantificado e a síntese de cDNA foi realizada usando o Kit para transcrição reversa (Thermo Scientific, RevertAid First Strand cDNA Synthesis, Cat: K1622), seguindo as recomendações do fabricante.

O Real Time – PCR foi realizado no equipamento da Applied Biosystems (7300 Real time PCR System) usando os ensaios TaqMan™ (Thermo Fisher) (Tabela 3) junto com o TaqMan™ Universal Master Mix II, com UNG (ThermoFisher Cat: 4440038), seguindo as recomendações do fabricante.

Gene	Referência/Catálogo
ACTA2	Rn01759928_g1/4331182
MYH11	Rn01530328_g1/4351372
Smoothelin	Rn01453095_m1/4331182
GAPDH	Rn99999916_s1/4331182

Tabela 3. Ensaio TaqMan™ usados nos experimentos de RT-PCR

1.10 Análises de imagens

A análise das imagens foi realizada usando o software ImageJ (Fiji). Na análise morfométrica, cada célula foi circundada para a obtenção dos valores de área, perímetro e circularidade. A trajetória de migração de cada célula foi realizada usando o plugin *Manual Tracking*.

O agrupamento das CMLs no Matrigel foi realizado quantificando a distância inicial entre uma célula e sua vizinha mais próxima no tempo 0 h, observando a formação dos grupos celulares em um tempo de 15 h.

1.11 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 6. Os dados foram analisados utilizando o teste de Student ou Mann Whitney, para dois grupos, ou teste ANOVA ou Kruskal-Wallis, para múltiplos grupos com pós-teste de comparação. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM).

2. Resultados

2.1 Obtenção de CMLs a partir de explantes de próstata ventral de rato

As CMLs em cultura (passagens 4-7) foram positivas para SM-actina e MYH11, marcadores do fenótipo contrátil. A localização da SM-actina foi citoplasmática, formando filamentos, enquanto MYH11 apresentava uma distribuição citoplasmática acentuada na região perinuclear (Fig. 1).

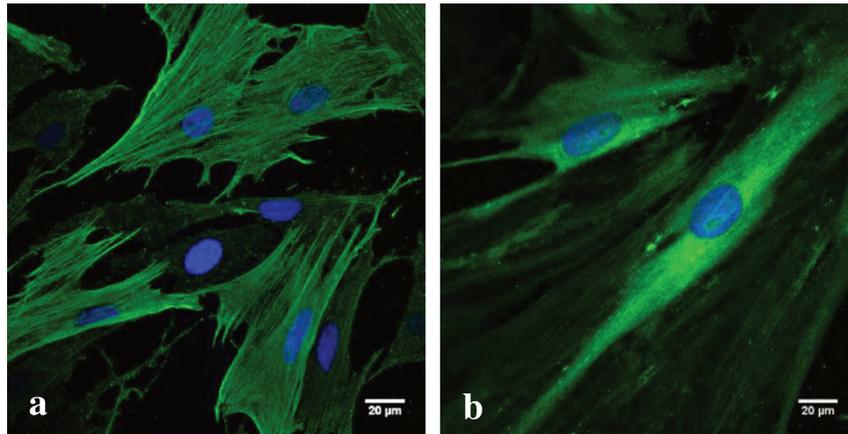


Figura 1. Imunofluorescência. SM-actina (a) e MYH11 (b) nas CMLs cultivadas sem substrato. Barra de escala: 20µm.

2.2 Obtenção de colágeno tipo I a partir da cauda de rato

Após a eletroforese e coloração do gel com Coomassie Blue, observou-se o padrão típico de bandas do colágeno apresentando suas subunidades $\alpha_1(I)$, $\alpha_2(I)$, e $\beta/\gamma(I)$, confirmado que o principal componente extraído a partir dos tendões da cauda de rato é o colágeno tipo I (Fig. 2). Esse colágeno foi utilizado para cobrir a superfície das lamínulas e nos cultivos celulares subsequentes.

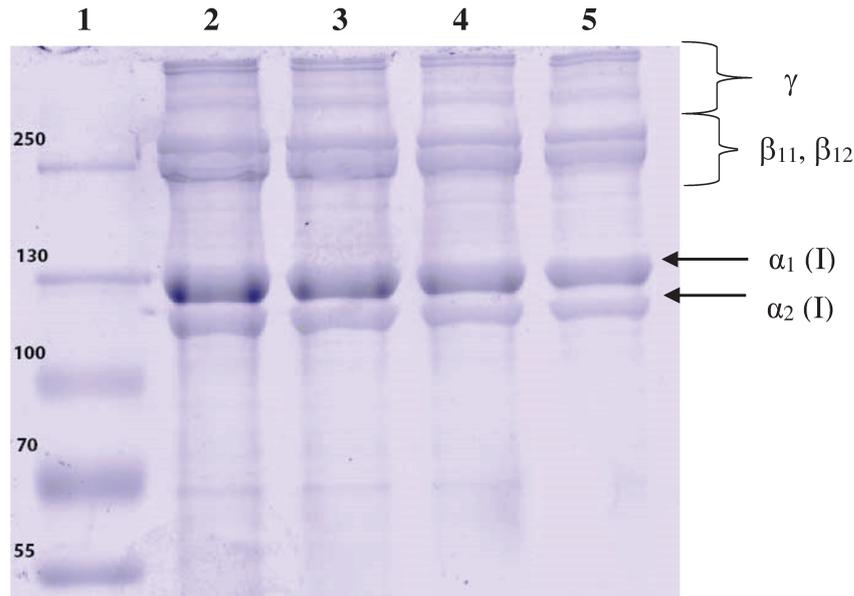


Figura 2. Eletroforese do colágeno obtido após a extração com ácido acético. Coluna 1: Marcador de peso molecular (KDa). Coluna 2 e 3: Solução de colágeno concentrada. Coluna 4 e 5: Solução de colágeno diluída (50%).

2.3 Influência dos componentes de MEC na adesão, espalhamento e morfologia das CMLs

Após 7 h de cultura, foi avaliada a adesão e o espalhamento das CMLs semeadas sobre os diferentes tipos de matriz (Fig. 3). Na ausência de componentes de MEC, as CMLs se aderem e espalham lentamente, mantendo uma morfologia circular durante esse tempo (Fig. 3a-d, Fig. 4). O colágeno tipo I permitiu uma rápida adesão e espalhamento das células, atingindo assim os maiores valores de área e perímetro. Nota-se também que as células neste substrato apresentaram uma morfologia circular com vários prolongamentos (Fig. 3e-h, Fig. 4). As células semeadas na fibrina se espalharam pouco durante o tempo analisado e se caracterizaram por ter uma morfologia alongada com múltiplas projeções (Fig. 3i-l, Fig. 4). No Matrigel, a maioria das células se movimentaram e emitiram prolongamentos que levaram à formação de grupos celulares, desde as primeiras horas de cultura (Fig. 3m-p, Fig. 4). Neste componente de matriz também foi estudada a formação desses grupos celulares quantificando a distância inicial com sua célula vizinha mais próxima, após semeadas durante um tempo de 15 h. Nestas condições, as células que apresentaram menor distância entre si agruparam-se em um tempo inferior a 5 h. Já as células que ficaram distantes desde o começo tardaram ao redor de 10 h para se agrupar. Contudo, houveram células que não se agruparam mesmo depois de 15 h, independente da distância inicial com sua vizinha mais próxima (Fig. 5).

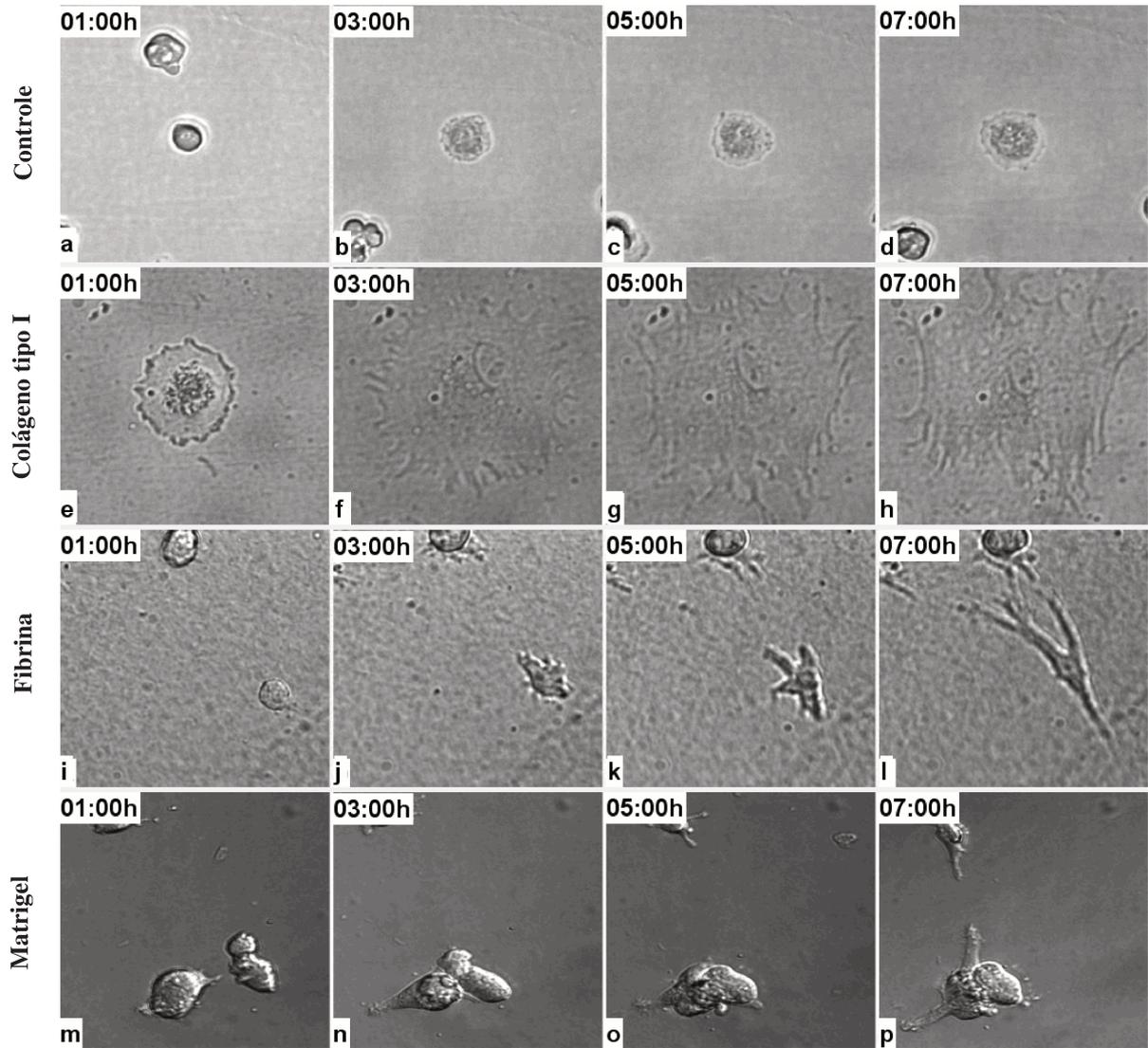


Figura 3. Comportamento das CMLs semeadas sobre diferentes componentes de matriz extracelular. Como controle, foram utilizadas células semeadas sem substrato (a-d). No colágeno (e-h), as CMLs se espalharam e aderiram rapidamente. Na fibrina (i-l), as CMLs apresentaram vários prolongamentos. No Matrigel (m-p), as CMLs apresentaram prolongamentos que permitiam a interação com outras células e a formação de grupos celulares. Imagens adquiridas com objetiva de 20X.

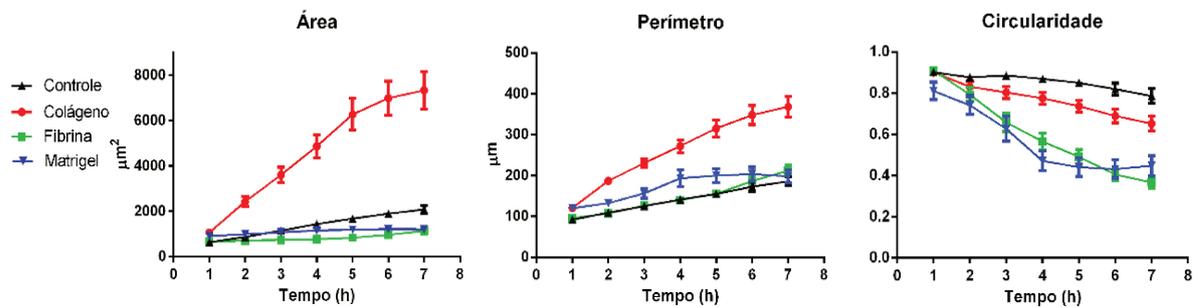


Figura 4. Análise morfométrica das CMLs após 7 h de cultura sobre os diferentes substratos. Como controle, foram analisadas as CMLs semeadas sem a presença de substrato. O colágeno propicia uma rápida adesão e espalhamento quando comparado com os outros substratos. Enquanto que as células semeadas na fibrina e Matrigel adquirem uma morfologia mais alongada. Circularidade (Valores próximos a 1 e próximos a 0 uma indicam uma morfologia circular e alongada, respetivamente). Controle, colágeno e fibrina (n = 30 células); Matrigel (n = 14 células). Média ± EPM.

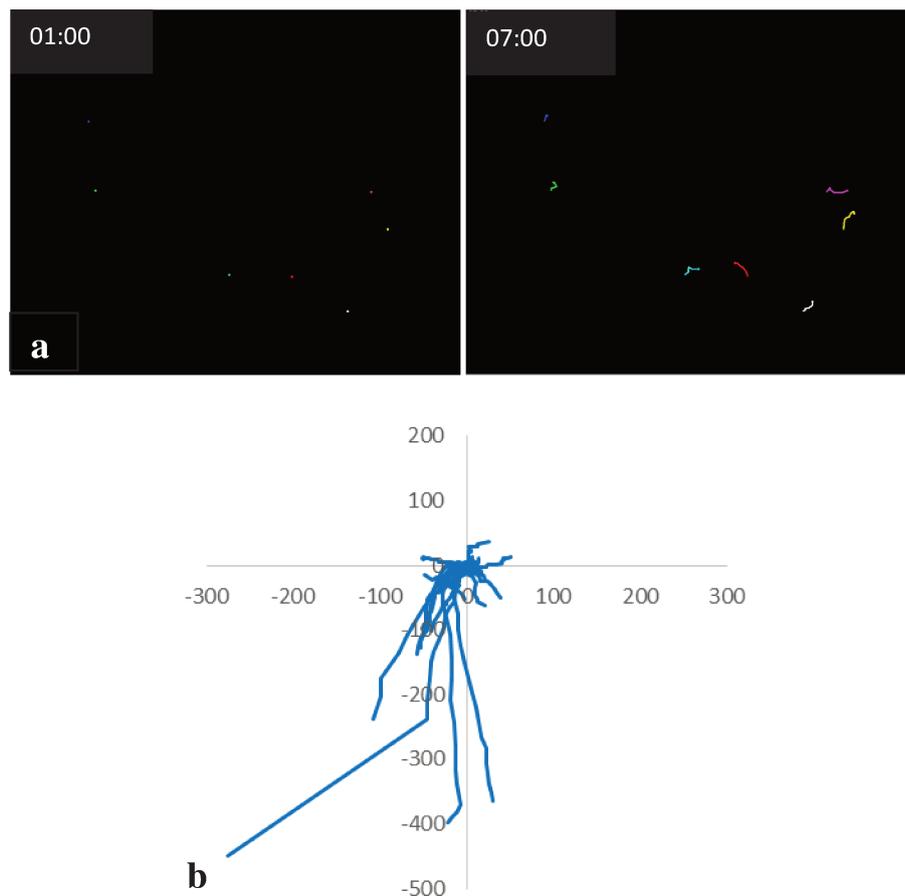


Figura 6. Trajetória de migração das CMLs semeadas sobre Matrigel durante 7 h de cultura (a). Distância percorrida (μm) de 30 células (b), cada linha mostra a trajetória de uma única célula.

2.4 Influência dos componentes de MEC no comportamento e organização do citoesqueleto de actina nas CMLs

Após 48 h de cultura, as CMLs sobre colágeno apresentaram um citoplasma amplo com fibras de estresse bem evidentes quando marcadas com Faloidina-TRITC (Fig. 7b). As imagens no decorrer do tempo evidenciaram a contração dessa matriz (Fig. 8a). Observou-se que as CMLs sobre o gel de fibrina tinham um aspecto estrelado (Fig. 7c), assim como, unicamente na presença destas células, acontecia a degradação do substrato (Fig. 8b). Com a incorporação de gelatina-FITC na fibrina, as áreas de degradação eram observadas como regiões escuras. Sobre Matrigel, as CMLs emitiram vários prolongamentos durante as primeiras horas de cultura (Fig. 3m-p) e, posteriormente, algumas células formaram grupos celulares, bem como apresentaram mudanças na forma do núcleo (Fig. 7d) e contração do gel (Fig. 8c). Sobre a fibrina e sobre o Matrigel, as CMLs encontravam-se aderidas à matriz, porém o citoesqueleto de actina perdeu o padrão típico observado quando as células foram cultivadas sem substrato ou no colágeno tipo I.

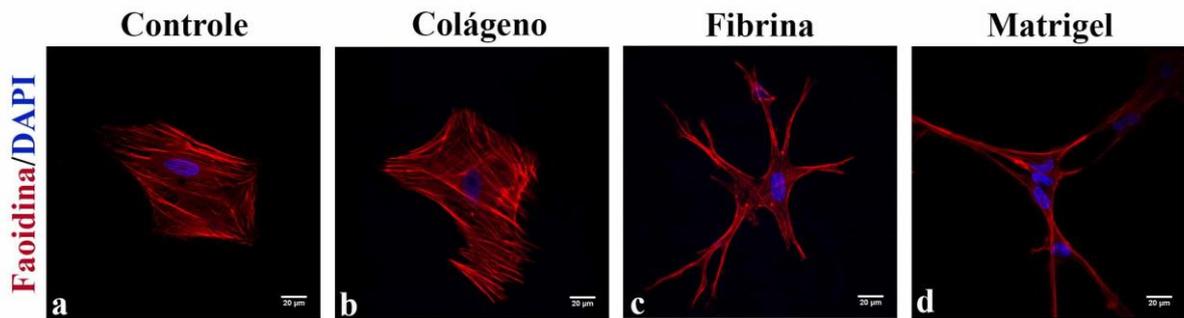


Figura 7. CMLs marcadas com Faloidina-TRITC e DAPI após 48 h de cultura. As células controle (a) e aquelas semeadas no colágeno tipo I (b) apresentaram grandes fibras de estresse. Enquanto esse padrão de organização não foi observado nas CMLs sobre fibrina (c) e nem sobre Matrigel (d).

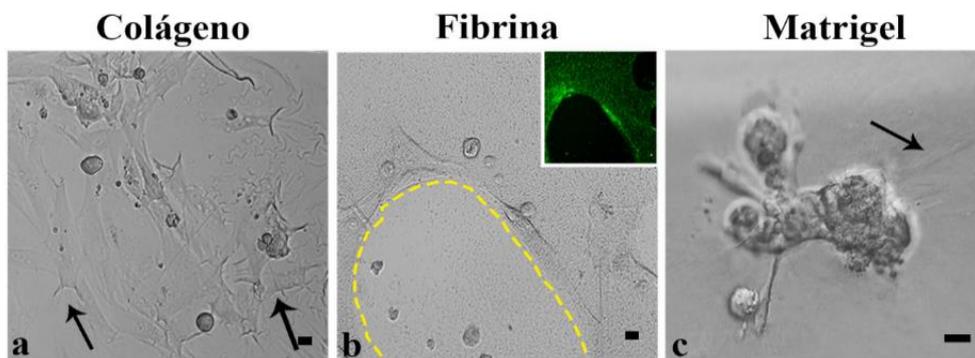


Figura 8. CMLs semeadas sobre os diferentes substratos após 48 h de cultura. Colágeno (a), observa-se contração da matriz de colágeno (setas). Fibrina (b), CMLs promoveram a degradação da matriz de fibrina (linha pontilhada amarela), fibrina com a incorporação de 5% de gelatina conjugada com FITC (em destaque no canto superior direito). Matrigel (c) as CMLs formaram grupos celulares, também se observou contração do gel (seta). Barra de escala: 20µm.

Na microscopia eletrônica de transmissão, as CMLs controle e semeadas sobre colágeno apresentaram grandes feixes de actina, onde é possível a visualização dos corpos densos. Em alguns locais, pode ser observado a ramificação de grandes feixes de actina (Fig. 9a-b). Entretanto, o citoesqueleto de actina das células sobre fibrina e Matrigel estava organizado em forma de malha (Fig. 9c-d).

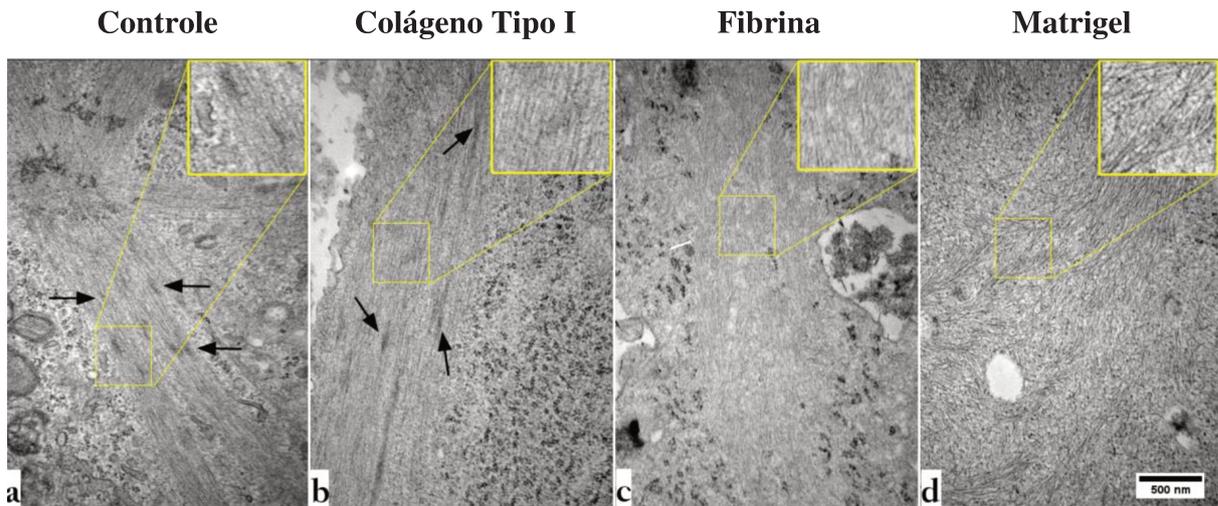


Figura 9. Ultraestrutura das CMLs semeadas sobre substratos após 48h de cultura. CMLs controle e semeadas sobre colágeno tipo I apresentam grandes feixes de actina e corpos densos (seta fina) (a-b). CMLs sobre fibrina e sobre Matrigel apresentaram filamentos de actina com disposição de malha (c-d).

2.5 Influência dos componentes de MEC no fenótipo das CMLs

Após 48 h de cultura sobre os diferentes substratos, a quantidade da proteína SM-actina nas CMLs não apresentou diferenças significativas (Fig. 10). Não obstante, a expressão de RNAm para ACTA2 e MYH11 foi diminuída quando as células foram semeadas sobre a fibrina e o Matrigel, enquanto a quantidade de RNAm para *Smoothelin* diminuiu significativamente em todos os grupos (Fig. 11).

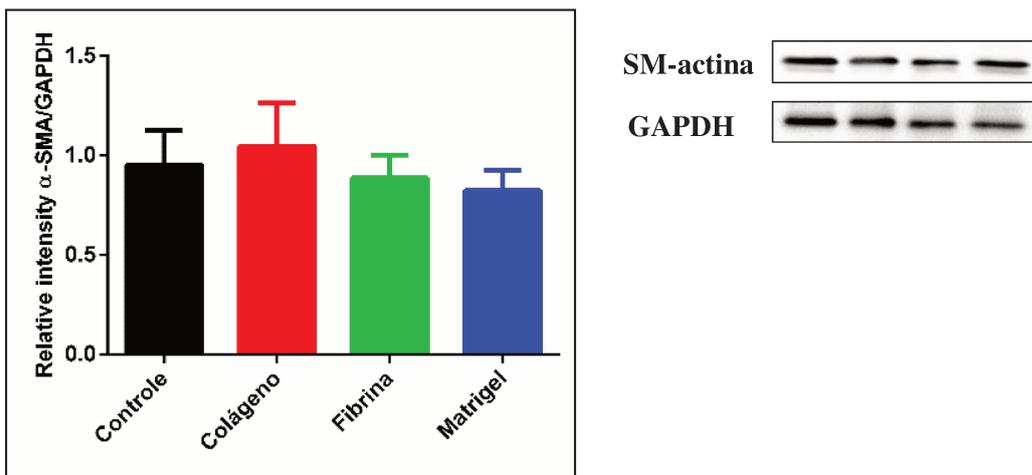


Figura 10. Western blotting para SM-actina após 48 h. Não há diferenças na quantidade de actina nas CMLs semeadas sobre diferentes componentes de MEC (n = 4). Média \pm EPM.

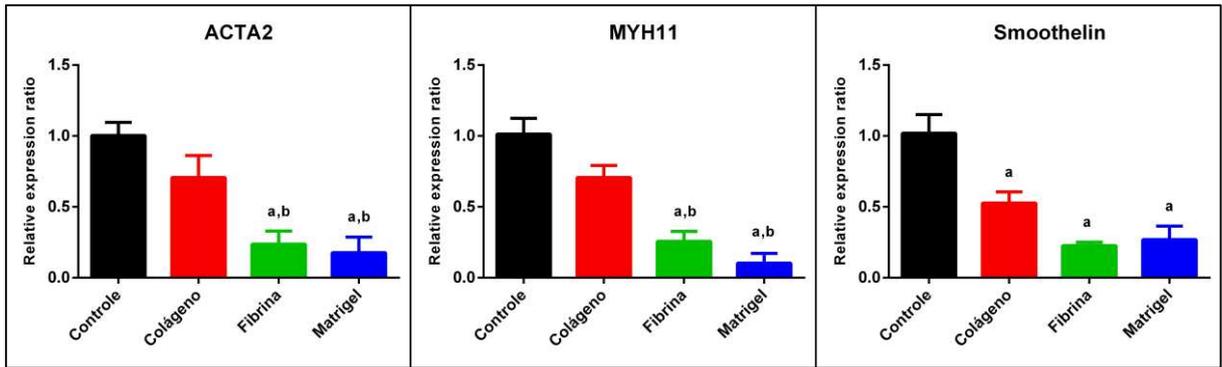


Figura 11. RT-PCR para alguns dos genes relacionados ao fenótipo contrátil. Fibrina e Matrigel apresentaram uma diminuição de ACTA2 e MYH11. *Smoothelin* diminuiu em todos os grupos (n=3). Média \pm EPM.

3. Discussão

Neste trabalho apresentamos o comportamento das CMLs derivadas de explantes de próstata semeadas sobre diferentes componentes de MEC. Começamos observando a adesão destas células aos diferentes substratos, sendo que o colágeno foi o componente que favoreceu a mais rápida adesão das células. A adesão da célula ao substrato depende do reconhecimento da superfície por parte da célula, evento que acontece em um tempo menor a um segundo. Os receptores de membrana desempenham um papel chave na adesão ao substrato pois a interação receptor-substrato levará à formação de adesões e ao posterior espalhamento da célula (Cohen et al., 2004). Sendo que os receptores envolvidos na adesão das células ao colágeno são as integrinas $\alpha1\beta1$ e $\alpha2\beta1$, provavelmente há uma alta quantidade destes receptores que favorecem a rápida adesão (Cohen et al., 2004; Huttenlocher and Horwitz, 2011; Moiseeva, 2001).

A ausência de componentes de MEC na superfície da placa de cultura dificulta a adesão das células como observado no grupo controle durante as primeiras horas de cultura. No entanto, as características morfológicas e a organização do citoesqueleto são semelhantes entre células que foram semeadas sem substrato e aquelas sobre colágeno tipo I após 48 h. Componentes presentes no SFB, como fibronectina e vitronectina, dariam condições para a adesão das células, e posteriormente a produção de mais constituintes de matriz por parte das células (Hayman et al., 1985).

Na próstata de roedores, sob condições normais, as CMLs estão em contato com sua membrana basal e com os componentes fibrilares do estroma, mas após a castração, as CMLs entram em contato com um novo componente que não é habitual sua presença na próstata, trata-se da fibrina, formada devido à apoptose das células endoteliais e extravasamento de fibrinogênio (Shabisgh et al., 1999). Na presença de fibrina, as CMLs apresentaram uma morfologia alongada com vários prolongamentos, efeito que tem sido observado também nas CMLv (células musculares lisas vasculares) *in vitro* (Naito et al., 1996) e que assemelha muito ao que acontece com as CMLs de próstata *in vivo*, após a privação androgênica (Antonioli et al., 2004).

Géis de fibrina são usados como carregadores de células devido a sua fácil obtenção, ausência de resposta imunológica e degradação natural após o enxerto (Li et al., 2015). As CMLv, quando colocadas sobre a matriz de fibrina, promovem a degradação desse substrato e o depósito de componentes da MEC, como colágeno e elastina (Ahmann et al., 2010; Allen and Wang, 2011). O processo de degradação da fibrina, na presença de CMLv, está relacionado à

ativação da plasmina, que tem como substrato a fibrina. Os mecanismos envolvidos na ativação dessa serina protease podem estar relacionados ao uso endógeno de ativadores de plasminogênio, como o uPA (ativador de plasminogênio tipo uroquinase) (Ahmann et al., 2010). As CMLs de próstata semeadas sobre fibrina por 48 h têm a capacidade de degradar a matriz, sugerindo que eventos similares aos observados com as CMLv acontecem nesta condição.

Tem sido reportado que em condições *in vitro*, o fibrinogênio, um componente solúvel do plasma, pode funcionar como um fator quimiostático para as CMLv e a migração das células é diretamente proporcional à concentração de fibrinogênio (Naito et al., 1996). O fibrinogênio, mediante a ação da trombina sofre conversão a fibrina, que é insolúvel. Posteriormente, Naito e colaboradores (1996) descreveram que a malha de fibrina que está em contato com as CMLv induz haptotaxis, que junto com a quimiotaxia estão envolvidos na patogênese vascular (Naito et al., 1996). Embora haja semelhanças entre as CMLs de próstata e as CMLv, não foi observado migração das CMLs prostáticas quando semeadas sobre a fibrina.

A capacidade das CMLs de modular seu fenótipo frente a diferentes condições permite identificar dois fenótipos das células musculares lisas (contrátil e sintético/proliferativo), que podem estar presentes no mesmo tecido. A principal característica do fenótipo contrátil é a presença de um aparato contrátil totalmente estruturado, enquanto que o fenótipo sintético/proliferativo se caracteriza pela ampla produção de proteínas da matriz extracelular, alta taxa proliferativa (Beamish et al., 2010), e a presença de um extenso sistema sintético-secretor (Vilamaior et al., 2005).

As CMLv em cultura perdem suas características de célula contrátil através das sucessivas passagens e adquirem um fenótipo mais proliferativo. A expressão de marcadores como SM-actina, MYH, SM-2, vinculina e calponina diminuem, enquanto β -actina e vimentina aumentam, processo que é acompanhado com a reorganização do citoesqueleto (Worth et al., 2001). No caso de CMLs provenientes de explantes de próstata, elas expressaram marcadores do fenótipo contrátil como SM-actina, MYH11 entre outros, através das sucessivas passagens, indicando que elas ganham características do fenótipo contrátil diferente das CMLv.

Chang e colaboradores (2014), usando moldes de litografia com padrão definido e recobertos com laminina e fibronectina, demonstraram que o fenótipo sintético das CMLv em cultura, após 7 passagens, pode ser revertido a um fenótipo contrátil em um período de 24 h (Chang et al., 2014). Em um experimento similar, Hayward e colaboradores (1995) estudaram

os efeitos no fenótipo nas CMLv dos principais componentes da MEC com os quais estão em contato. Assim, CMLv da aorta de coelho foram expostas, de maneira separada, a colágeno tipo I, colágeno tipo IV, laminina e fibronectina. Segundo seus resultados, Hayward concluiu que a laminina é o componente que mais favorece o fenótipo contrátil, seguido pelo colágeno tipo IV. Já o colágeno tipo I e fibronectina são o que menos favorecem a diferenciação das CMLv (Hayward et al., 1995). O colágeno tipo IV tem sido usado para manter o fenótipo diferenciado das CMLv após o seu isolamento do tecido e os efeitos na organização das proteínas do citoesqueleto foram analisados em diferentes componentes de MEC durante as sucessivas passagens (Worth et al., 2001). Esses resultados indicam que fibronectina e colágeno tipo I promovem o fenótipo sintético, enquanto laminina e o colágeno tipo IV favorecem o fenótipo contrátil (Baker and Southgate, 2008; Hirst et al., 2000). As CMLs de próstata semeadas sobre Matrigel, cujos principais componentes são laminina e colágeno tipo IV, diminuíram os marcadores de diferenciação, indicando diferenças entre as CMLv e as CMLs de próstata em resposta a componentes de MEC.

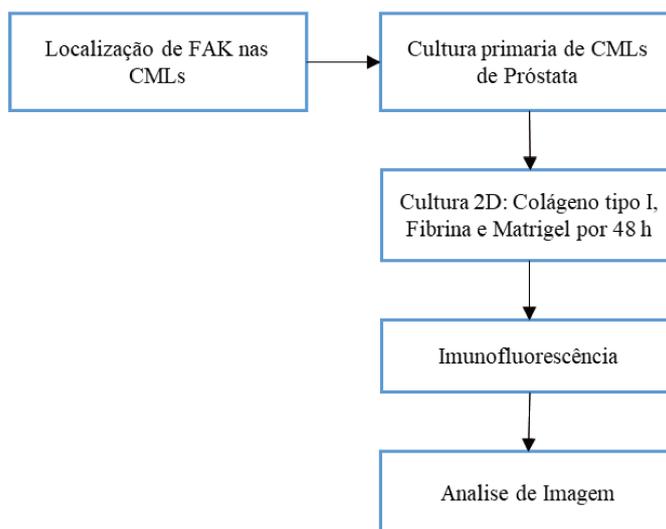
4. Conclusões

- O colágeno tipo I propicia a rápida adesão e espalhamento das CMLs.
- O colágeno tipo I favorece a formação de grandes fibras de estresse nas CMLs.
- O Matrigel desencadeia a migração das CMLs e a formação de grupos celulares.
- O citoesqueleto de actina nas CMLs semeadas sobre fibrina e Matrigel encontra-se organizado em forma de rede.
- CMLs semeadas sobre fibrina e Matrigel reduzem a expressão de ACTA2 sem alterar os níveis da proteína SM-actina, após 48 h de cultura.
- Componentes de MEC regulam a expressão de ACTA2, MYH11 e *Smoothelin* nas CMLs, após 48 h de cultura.

CAPÍTULO II

Quinase de adesão focal (FAK) e sua distribuição nas CMLs

Neste capítulo descrevemos a localização da FAK e suas formas fosforiladas nas CMLs semeadas sobre diferentes componentes de MEC e sua co-localização com SM-actina e MYH11.



Esquema ilustrativo que resume a metodologia utilizada e sua finalidade neste capítulo.

1. Material e métodos

1.1 Cultura e imunofluorescência de CMLs sobre componentes de MEC

A obtenção e cultura de CMLs a partir de explantes de próstata ventral de ratos segue a mesma metodologia usada no capítulo I itens 1.1 e 1.4.

Para imunofluorescência, 5000 CMLs/poço (placa de 24 poços) foram semeadas sobre lamínulas de vidro cobertas com colágeno tipo I ou fibrina ou Matrigel. Após 48 h de cultura, as CMLs foram fixadas com PFA 4% contendo 0,6 % de Triton X-100 e sacarose 4%, durante 20 min e lavadas com PBS (3 vezes por 5 min). Posteriormente, foi adicionado PBS-T 0,1% (Tween 20), por 5 min. Após esse tempo foram realizadas lavagens com PBS (3 vezes por 5 min). O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito com solução de albumina de soro bovino (BSA) 3% diluída em PBS por 1 h, contendo 0,8% de Triton X-100. As células foram então incubadas com anticorpo primário (Tabela 1) *overnight*, a 4°C em câmara úmida. No dia seguinte, foram feitas lavagens com PBS (3 vezes, por 5 min cada) e em seguida realizou-se a incubação com anticorpos secundários específicos (Tabela 1) e DAPI por 1 h, em câmara

úmida, no escuro. As imagens foram adquiridas usando o microscópio confocal LSM780 (Carl Zeiss).

Anticorpo Primário	Fabricante/Catálogo	Diluição
SM-actina	Thermo Fisher/MA5-11547	1:100
MYH11	Abcam/ab683	1:200
FAK A17 (Total)	Santa Cruz Biotechnology/SC-557	1:100
FAKpY397	Novus Biologicals	1:100
FAKpY925	GeneTex/GTX50185	1:100

Anticorpos Secundário	Fabricante/Catálogo	Diluição
Alexa Fluor 488	Invitrogen/ A32723	1:2000
Alexa Fluor 546	Invitrogen/ A11035	1:2000

Tabela 1. Anticorpos primários e secundários usados nos experimentos de imunofluorescência.

1.2 Análises de imagens

A análise das imagens foi realizada usando o software ImageJ (Fiji). A intensidade da FAK e suas formas fosforiladas nas células foram visualizadas usando Lookup Tables > Fire.

Na co-localização foi traçada uma linha através da célula que permitisse criar um perfil de intensidade de cada proteína e, posteriormente, comparar graficamente a sobreposição entre elas.

2. Resultados

2.1 Localização de FAK total e co-localização com componentes do citoesqueleto após 48h

Células semeadas sem substrato (controle) e no colágeno tipo I apresentaram marcação citoplasmática para FAK total, principalmente na região da membrana celular onde faz parte das adesões focais. No citoplasma, há distribuição em forma de feixes e uma alta quantidade de FAK na região nuclear e perinuclear (Fig. 1a-b). Na fibrina e no Matrigel, a FAK não está presente no núcleo, mas pode ser observada no citoplasma como agregados (Fig. 1c-d).

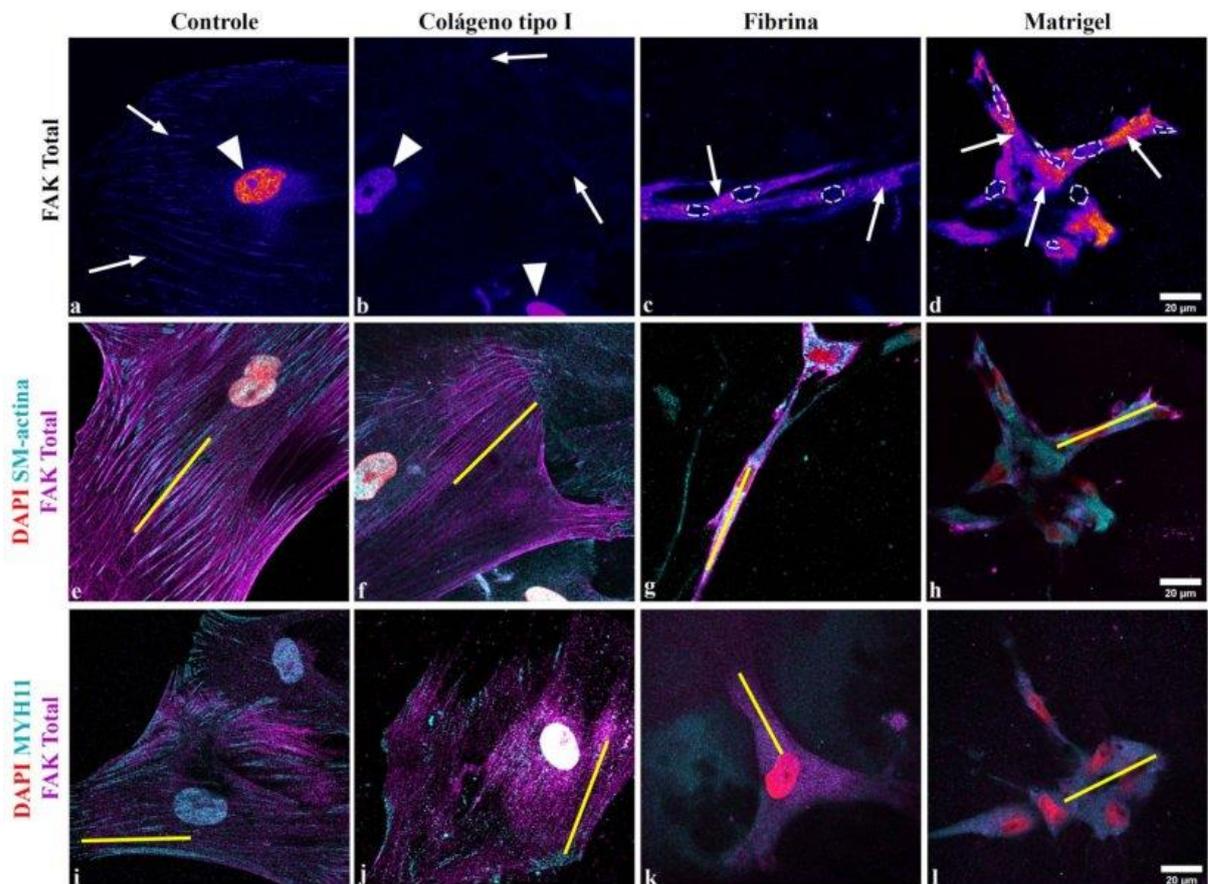


Figura 1. Imunofluorescência para FAK total, SM-actina e MYH11 nas CMLs após 48h de cultura sobre componentes de MEC. Microfotografias de um único plano focal (Z). No controle e colágeno (a, b), a FAK está presente nas adesões focais (seta) e no núcleo (cabeça de seta). A FAK forma agregados no citoplasma na fibrina e no Matrigel (seta) (c, d), não há localização nuclear (linha tracejada branca). A actina se encontra formando filamentos no controle e no colágeno (e-f), esse padrão de organização não é observado nas células semeadas na fibrina e no Matrigel (g-h). A FAK acompanha os filamentos de actina. A MYH11 encontra-se no citoplasma com uma marcação acentuada na região perinuclear no controle e no colágeno (i-j). Na fibrina e no Matrigel (k-l), a MYH11 está difusa no citoplasma. A linha amarela foi usada como referência para fazer análise de co-localização.

Nas células controle e aquelas semeadas no colágeno, a dupla marcação de FAK com SM-actina permitiu observar a co-localização com os feixes de actina (Fig. 1e, f). A MYH11 encontrava-se de maneira mais acentuada na região perinuclear e em feixes finos no citoplasma com co-localização com a FAK em algumas regiões (Fig. 1i-j). Na fibrina e no Matrigel, SM-actina e MYH11 encontraram-se difusas no citoplasma sem a formação de feixes (Fig. 1g-h, k-l). Houve uma maior sobreposição de SM-actina e MYH11 com a FAK total na fibrina como apresentado no perfil de intensidade para essas proteínas (Fig. 2).

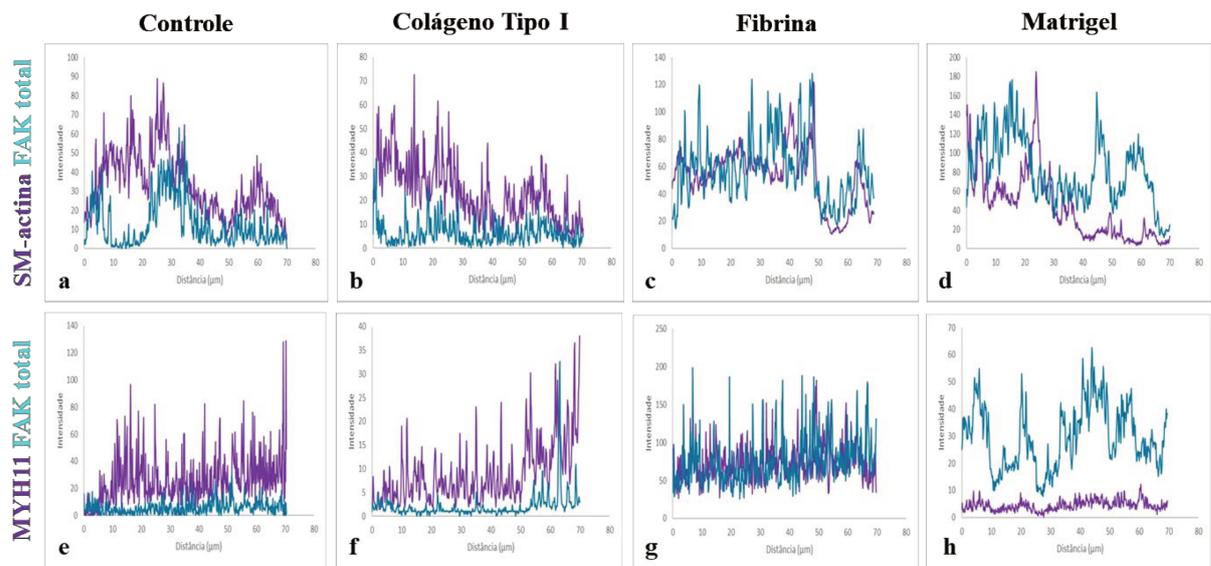


Figura 2. Perfil de intensidade de SM-actina-FAK total e MYH11-FAK total correspondente a cada linha amarela destacada na Figura 1. O perfil foi realizado da periferia da célula ao centro. A sobreposição entre os picos revela estreita associação da FAK total com SM-actina e MYH11 na fibrina.

2.2 Localização de FAKpY397 e co-localização com componentes do citoesqueleto após 48h

No controle e colágeno, a FAKpY397 estava presente nas adesões focais, mas com uma baixa quantidade desta forma fosforilada no núcleo. Ainda se mantém uma distribuição em forma de feixes (Fig. 3a-b). A FAKpY397 parece seguir um padrão de distribuição que acompanha alguns filamentos de actina, enquanto outros atravessam diagonalmente sem uma aparente interação com os feixes de actina (Fig. 3d, e). A FAKpY397 também apresenta uma sobreposição com a MYH11 em algumas regiões. No Matrigel, se mantêm a ausência da marcação nuclear e continuam sendo observados os agregados citoplasmáticos desta proteína (Fig. 3c). O perfil de intensidade apresentou uma sobreposição da FAKpY397 com os feixes de actina e MYH11, sendo esta mais estreita nas células semeadas no colágeno (Fig. 3).

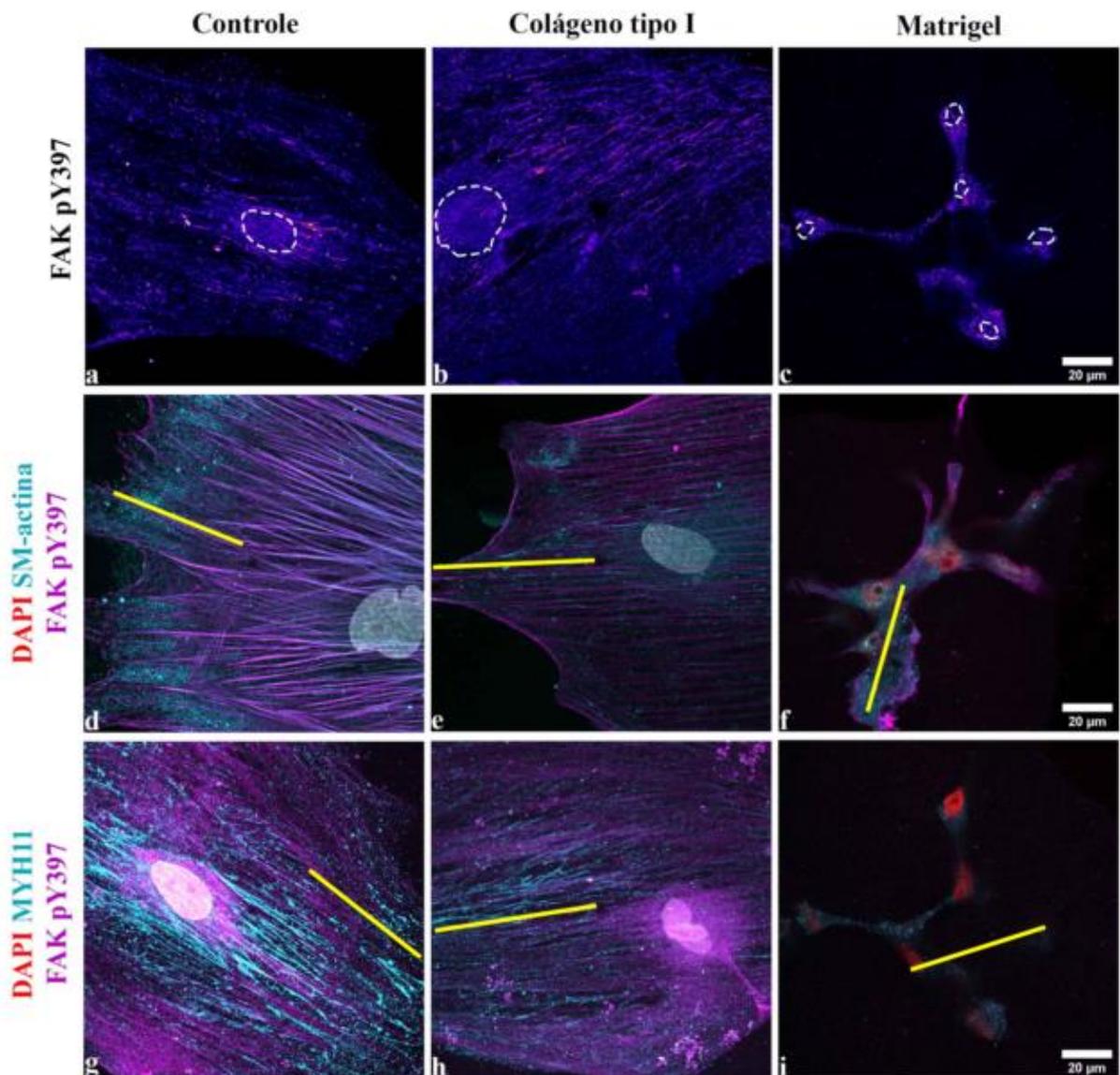


Figura 3. Imunofluorescência para FAKpY397, SM-actina e MYH11 nas CMLs após 48h de cultura sobre componentes de MEC. Microfotografias de um único plano focal (Z). A FAKpY397 no controle e colágeno (**a**, **b**) apresentou uma organização em forma de feixes e também se localiza nas adesões focais. Há uma baixa quantidade no núcleo (linha tracejada branca). No Matrigel, FAKpY397 (**i**, **j**) está ausente no núcleo (linha tracejada branca) e se mantem os agregados no citoplasma (seta fina). A linha amarela foi usada como referência para fazer análise de co-localização.

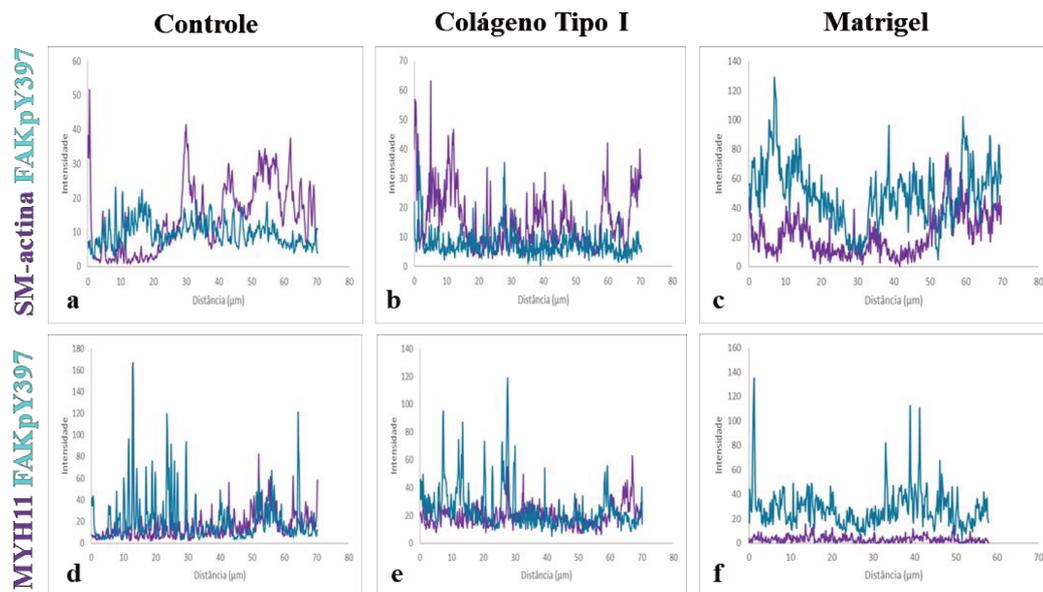


Figura 4. Perfil de intensidade de SM-actina-FAKpY397 e MYH11-FAKpY397 correspondente a cada linha amarela destacada na Figura 3. O perfil foi realizado da periferia da célula ao centro. A sobreposição entre os picos revela estreita associação da FAKpY397 total com SM-actina e MYH11 no colágeno.

2.3 Localização de FAKpY925 e interação com componentes do citoesqueleto após 48h

No controle e colágeno, a FAKpY925 encontra-se no citoplasma onde acompanha alguns feixes de actina (Fig. 5a-b, d-e). O núcleo apresenta uma baixa quantidade de FAKpY925, mas com um leve aumento quando comparada com a forma pY397. Além disso, na região perinuclear houve uma marcação bastante notória. A distribuição em formas de feixes e a presença nas adesões focais se manteve. No Matrigel (Fig. 5c), mantem-se a formação de agregados citoplasmáticos bem definidos sem marcação nuclear.

SM-actina e FAKpY925 apresentam co-localização em algumas regiões da célula. Entretanto, no Matrigel, a FAKpY925 tem maior sobreposição com SM-actina, já que ambas as proteínas estão difusas no citoplasma (Fig. 5d). MYH11 apresentou uma distribuição similar à de FAKpY925 quando semeadas no colágeno com uma mais estreita co-localização (Fig. 5h e Fig. 6e).

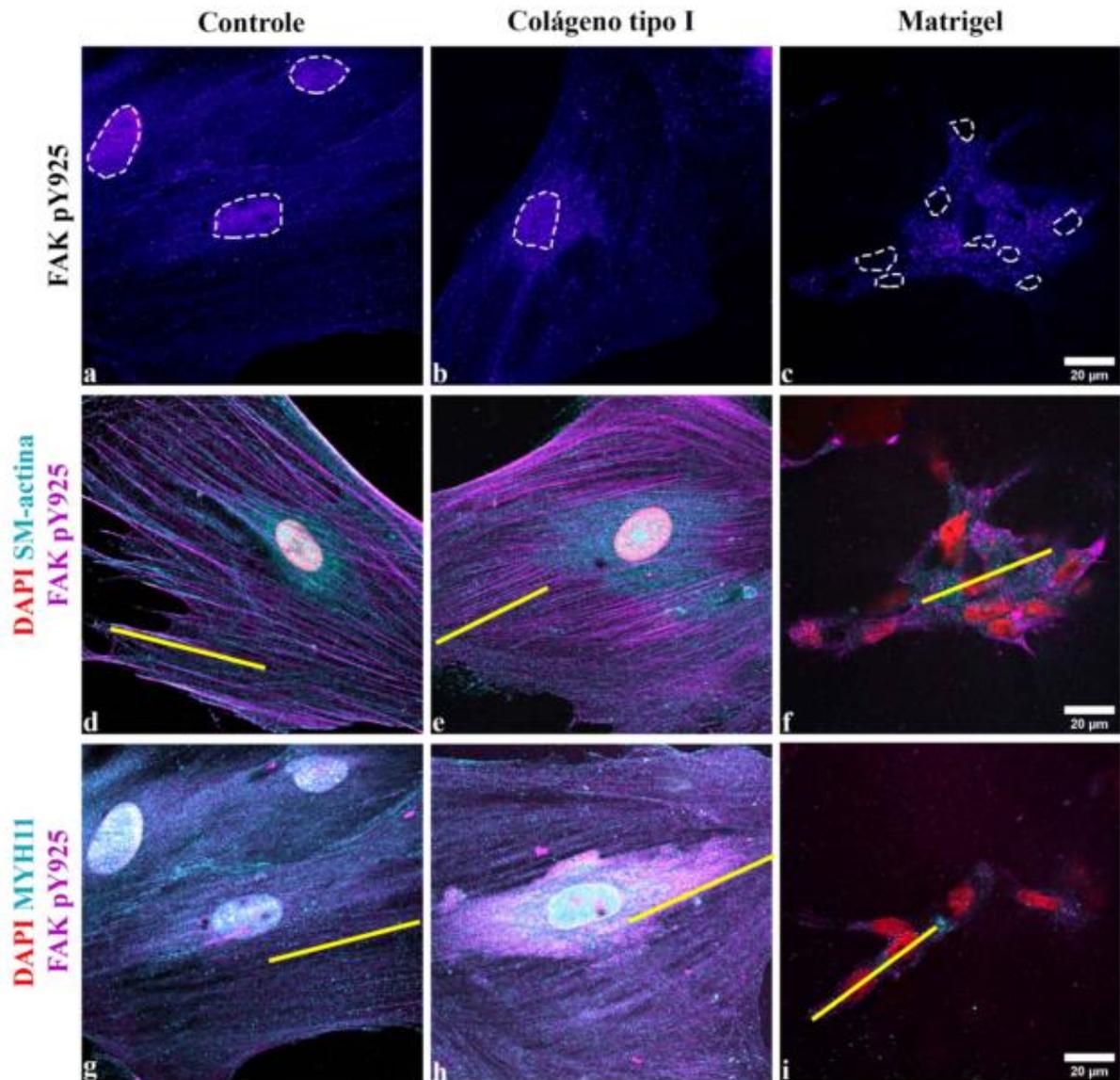


Figura 5. Imunofluorescência para FAKpY925, SM-actina e MYH11 nas CMLs após 48h de cultura sobre componentes de MEC. Microfotografias de um único plano focal (Z). A FAKpY925 no controle e colágeno (a, b) está localizada nas adesões focais, no núcleo e na região perinuclear, também é possível visualizar a organização em forma de feixes. No Matrigel a FAKpY925 (c) está ausente no núcleo (linha tracejada branca), mas presente no citoplasma como agregados (pontos vermelhos). A FAKpY925 acompanha uns filamentos de actina (d-e) e apresenta uma distribuição similar à da MYH11 (g-h). No Matrigel, as proteínas estão difusas (f-i). A linha amarela foi usada como referência para fazer análise de co-localização.

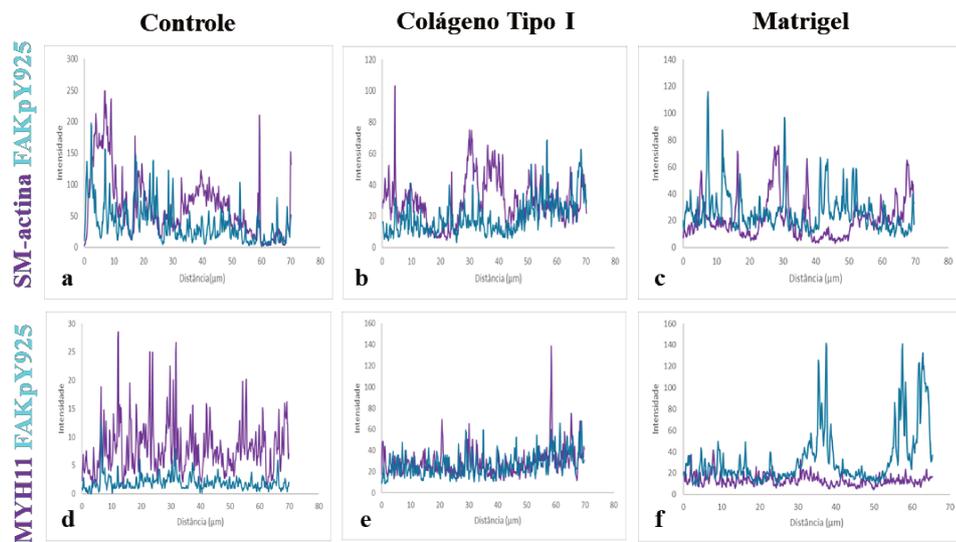


Figura 6. Perfil de intensidade de SM-actina-FAKpY397 e MYH11-FAKpY397 correspondente a cada linha amarela destacada na Figura 5. O perfil foi realizado da periferia da célula ao centro. A sobreposição entre os picos revela estreita associação da FAKpY397 total com SM-actina e MYH11 que é mais evidente no colágeno.

3. Discussão

A proteína FAK é conhecida principalmente por estar localizada nas adesões focais. Contudo, esta proteína não atua simplesmente como proteína adaptadora nesses locais. A FAK interage com um grande grupo de proteínas para realizar diferentes funções. Algumas dessas estão relacionadas com o desenvolvimento embrionário e na homeostase dos tecidos normais. Além disso, ela está presente nas junções aderentes, endossomos e no núcleo (Arold, 2011; Kleinschmidt and Schlaepfer, 2017). No núcleo, favorece a sobrevivência celular promovendo a degradação da p53 (Lim et al., 2008).

Os resultados de imunofluorescência mostraram marcação para FAK e suas formas fosforiladas (Y397 e Y925) nas CMLs semeadas em diferentes componentes de MEC. Nas células controle e naquelas semeadas sobre colágeno, a FAK estava localizada nas adesões focais e, em altas quantidades, no núcleo. Nestas duas condições, a FAK está interagindo com os filamentos de actina nas adesões focais. A marcação total da FAK parece acompanhar os filamentos de actina, mas há uma maior sobreposição da forma Y925 com a MYH11 como apresentado nos gráficos de co-localização. *In vitro*, tem sido reportada a interação da FAK com o complexo Arp2/3 que induz a polimerização de actina para a formação de lamelipódios e espalhamento da célula. A autofosforilação em Y397 está envolvida na regulação dessa interação (Serrels et al., 2007).

Na fibrina e no Matrigel, as CMLs não apresentaram marcação nuclear sugerindo que a presença dessa proteína pode estar envolvida na manutenção do fenótipo contrátil, já que os marcadores deste fenótipo diminuíram nessas condições, como foi apresentado no capítulo I.

Na próstata, a FAK está localizada predominantemente nas células basais do epitélio e nas CMLs. Uma elevada expressão de FAK foi observada nos estágios iniciais de transformação maligna, podendo ser usada como um marcador no diagnóstico de câncer (Rovin et al., 2002; Tai et al., 2015). A FAK também pode ser uma proteína alvo para o tratamento de câncer, por sua elevada expressão em células cancerosas, mas o funcionamento desses inibidores deve estar associado às diferentes funções e localização da FAK para serem efetivos (Arold, 2011).

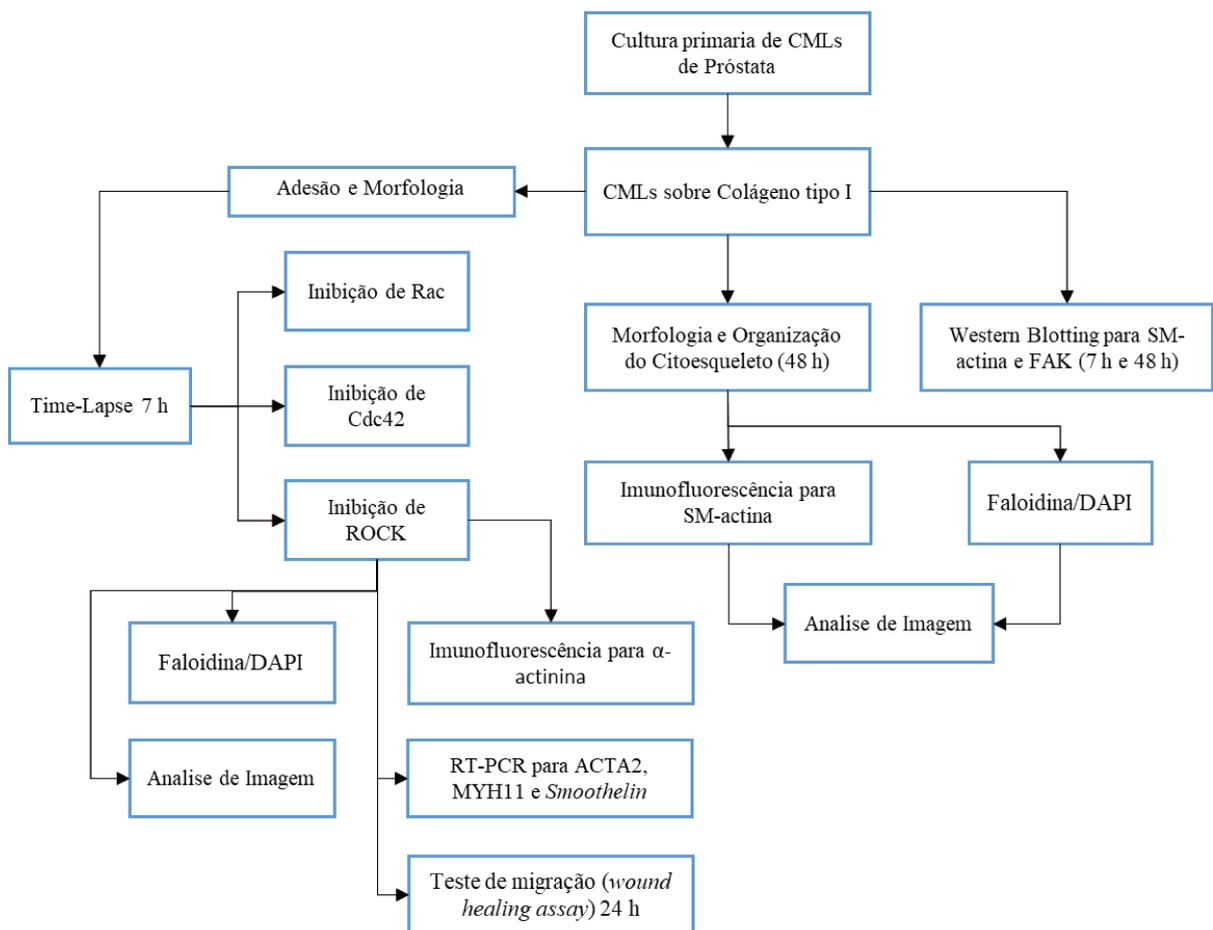
4. Conclusões

- A fibrina e o Matrigel induzem agregados de FAK no citoplasma.
- A MYH11 e FAKpY925 apresentam uma maior co-localização no colágeno.
- Ausência nuclear de FAK nas células semeadas sobre fibrina e Matrigel pode estar relacionada ao fenótipo sintético das CMLs.
- As formas fosforiladas da FAK (Y397 e Y925) podem estar relacionadas mais a funções estruturais e interação com componentes do citoesqueleto de actina.

CAPÍTULO III

Importância das Rho GTPases para adesão e espalhamento das CMLs no colágeno

No capítulo I observamos que as CMLs aderiram-se e espalharam-se rapidamente quando semeadas sobre colágeno tipo I. Neste capítulo estudamos o efeito da inibição da sinalização por Rho (ROCK, Rac e Cdc42) na adesão, na organização do citoesqueleto e nas adesões focais das CMLs semeadas sobre colágeno.



Esquema ilustrativo que resume a metodologia utilizada e sua finalidade neste capítulo.

1. Material e métodos

1.1 Cultura e imunofluorescência de CMLs

A obtenção e cultura de CMLs a partir de explantes de próstata ventral de ratos segue a mesma metodologia usada no capítulo I itens 1.1 e 1.4.

Para imunofluorescência, 5000 CMLs/poço (placa de 24 poços) foram semeadas sobre lamínulas de vidro cobertas com colágeno tipo I. As CMLs foram fixadas com PFA 4%

contendo 0,6 % de Triton X-100 e sacarose 4%, durante 20 min e lavadas com PBS (3 vezes por 5 min). Posteriormente, foi adicionado PBS-T 0,1% (Tween 20), por 5 min. Após esse tempo foram realizadas lavagens com PBS (3 vezes por 5 min). O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito com solução de albumina de soro bovino (BSA) 3% por 1 h, diluída em PBS, contendo 0,8% de Triton X-100. As células foram então incubadas com anticorpo primário (Tabela 1) *overnight*, a 4°C em câmara úmida. No dia seguinte, foram feitas lavagens com PBS (3 vezes, por 5 min cada) e em seguida realizou-se a incubação com anticorpos secundários específicos (Tabela 1) e DAPI por 1 h, em câmara úmida, no escuro. As imagens foram adquiridas usando o microscópio confocal LSM780 (Carl Zeiss).

Anticorpo Primário	Fabricante/Catálogo	Diluição
SM-actina	Thermo Fisher/MA5-11547	1:100
α -actinina	Novusbio/NBP1-22630	1:100

Anticorpos Secundário	Fabricante/Catálogo	Diluição
Alexa Fluor 488	Invitrogen/ A32723	1:2000
Alexa Fluor 546	Invitrogen/ A11035	1:2000

Tabela 1. Anticorpos primários e secundários usados nos experimentos de imunofluorescência.

1.2 Marcação com Faloidina-TRITC e DAPI

As células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4%, por 20 min, lavadas com PBS e marcadas com Faloidina-TRITC e DAPI para a análise morfológica e do citoesqueleto.

1.3 Western blotting

CMLs foram colocadas sobre os diferentes substratos e, após 48 h de cultura, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS, coletadas e incubadas com tampão RIPA (contendo inibidores de protease e fosfatase), por 30 min. Posteriormente, o resíduo insolúvel foi removido por centrifugação a 12000 rpm, por 20 min, a 4°C. O conteúdo de proteínas na solução foi quantificado pelo método de Bradford. 50 μ g de proteínas foram aplicados em gel de eletroforese (SDS-PAGE). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em sistema úmido da BioRad. Subsequentemente, as membranas

foram bloqueadas com BSA 5% em TBS-T e então incubadas com o anticorpo primário (Tabela 2) e colocadas *overnight*, a 4°C em agitação. No outro dia, a membrana foi incubada com os anticorpos secundários específicos (Tabela 2). O controle de carregamento do gel foi determinado pela quantidade de GAPDH. A detecção da proteína foi feita por quimiluminescência usando o kit de revelação da Santa Cruz Biotechnology (SC-2048).

Anticorpo Primário	Fabricante/Catálogo	Diluição
SM-actina	Thermo Fisher/MA5-11547	1:1000
GAPDH	Abcam/ab9485	1:1000
FAK A17 (Total)	Santa Cruz Biotechnology/SC-557	1:1000
FAKpY397	Novus Biologicals	1:1000

Anticorpos Secundário	Fabricante/Catálogo	Diluição
Anti-camundongo	Bio-Rad/1706516	1:5000
Anti-coelho	Bio-Rad/1706515	1:5000

Tabela 2. Anticorpos primários e secundários usados nos experimentos de WB.

1.4 Real Time - PCR

O RNA foi extraído usando o reagente TRIzol (Life Technologies, Cat:15596018) seguindo as recomendações do fabricante. Foram semeadas 20000 células/poço (placa de 24 poços) e, após 48 h de cultura, foi adicionado o TRIzol (400 µL/poço). O RNA foi separado com clorofórmio (200 µL para cada 1000 µL de TRIzol) e precipitado com Isopropanol absoluto (500µL para cada 1000µL de TRIzol). Uma etapa de lavagem foi realizada usando Etanol 75% e, finalmente, o RNA foi ressuspendido em 15 µL de água DEPC. O RNA foi quantificado e a síntese de cDNA foi realizada usando o Kit para transcrição reversa (Thermo Scientific, RevertAid First Strand cDNA Synthesis, Cat: K1622), seguindo as recomendações do fabricante.

O Real Time – PCR foi realizado no equipamento da Applied Biosystems (7300 Real time PCR System) usando os ensaios TaqMan™ (Thermo Fisher) (Tabela 3) junto com o TaqMan™ Universal Master Mix II, com UNG (ThermoFisher Cat: 4440038), seguindo as recomendações do fabricante.

Gene	Referência/Catálogo
ACTA2	Rn01759928_g1/4331182
MYH11	Rn01530328_g1/4351372
Smoothelin	Rn01453095_m1/4331182
GAPDH	Rn99999916_s1/4331182

Tabela 3. Ensaio TaqMan™ usados nos experimentos de RT-PCR

1.5 Efeito de inibidores da família Rho na adesão das CMLs

As CMLs foram semeadas sobre colágeno tipo I e diferentes concentrações dos inibidores foram usadas para testar o efeito da inibição das GTPases da família Rho na adesão. O comportamento das células foi filmado por um período de 7 h usando o sistema *time-lapse*. Rhodblock 6 foi usado para inibir ROCK (Sigma, Cat: R1283-5mg), EHop-016 (Sigma, Cat: SML0526-5mg) para a inibição de Rac1 e Rac3 e CASIN (Sigma, Cat: SML1253-5mg) para a inibição de Cdc42. Os inibidores foram diluídos em DMSO (dimetilsulfoxido) seguindo as recomendações do fabricante.

1.6 Teste de migração (*wound healing assay*) nas CMLs

A obtenção e cultura de CMLs a partir de explantes de próstata ventral de ratos segue a mesma metodologia usada no capítulo I item 1.1. Posteriormente, foram semeadas 30000 células/poço (placa de 24 poços) até atingir 90% de confluência. As células foram deixadas *overnight* em meio de cultura sem SFB e, posteriormente, foi feito um “risco” sobre a monocamada de células usando ponteira (200 µL) de micropipeta. A seguir, as células removidas foram retiradas após lavagem com PBS e as células aderidas foram mantidas com meio de cultura suplementado com 1% de SFB ou com a adição do inibidor de ROCK. A quantificação da área de migração foi feita a cada 8 h, por um intervalo total de 24 h.

1.7 Análises de imagens

A análise das imagens foi realizada usando o software ImageJ (Fiji).

Na análise morfométrica, cada célula foi circundada para a obtenção dos valores de área, perímetro e circularidade. A trajetória de migração de cada célula foi realizada usando o plugin *Manual Tracking* por um tempo 7 h, a cada 20 min. Um gráfico com as coordenadas de

migração foi feito no Excel. A velocidade e distância percorrida por cada célula foram também mensuradas.

Na análise de migração (*wound healing assay*), a área do risco no tempo 0 h foi considerada como 100% e a redução dessa área no decorrer do tempo foi quantificada.

A intensidade de fluorescência foi mensurada circundando cada célula e selecionando os valores de área, *integrated density* e *mean gray value*. A seguir, os valores foram colocados na seguinte fórmula, levando em consideração o background:

$$\text{Intensidade corrigida} = \text{Integrated Density} - (\text{Área da célula} \times \text{media de fluorescência das repetições do background})$$

1.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 6. Os dados foram analisados usando o teste de Student ou Mann Whitney, para comparar dois grupos ou o teste ANOVA, com pós teste de comparação, para três grupos ou mais. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM).

2. Resultados

2.1 Efeito do colágeno na morfologia das CMLs após 48 h em cultura.

As células semeadas sem substrato (controle) e aquelas sobre colágeno tipo I apresentavam uma morfologia similar após 48 h de cultura, porém, na morfometria, foi possível diferenciar que as células semeadas sobre o colágeno eram um pouco maiores e apresentaram uma morfologia levemente alongada (Fig. 1). A quantidade de actina (Fig. 2) não foi diferente nas duas condições após 48 h como foi demonstrado pela quantificação na intensidade de SM-actina e faloidina (Fig. 3) e pelo Western blotting (Fig. 4).

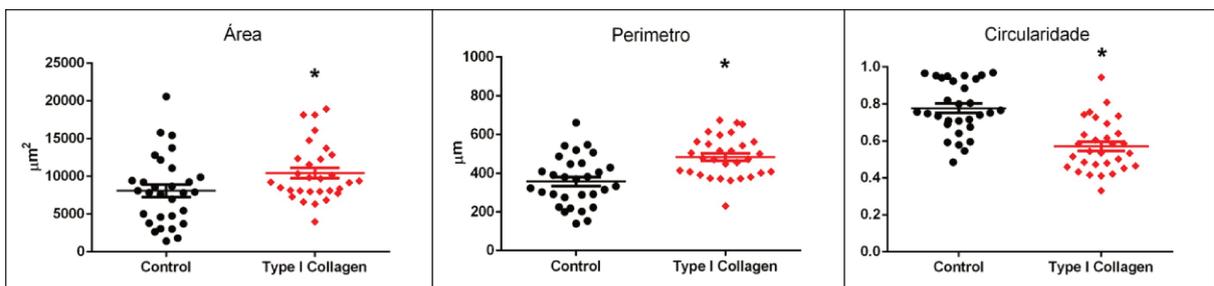


Figura 1. Comparação dos parâmetros morfológicos. CMLs controle e sobre colágeno após 48 h de cultura. O colágeno propicia um maior espalhamento das células ($n = 30$). Circularidade (Valores próximos a 1 e próximos a 0 uma indicam uma morfologia circular e alongada, respectivamente).

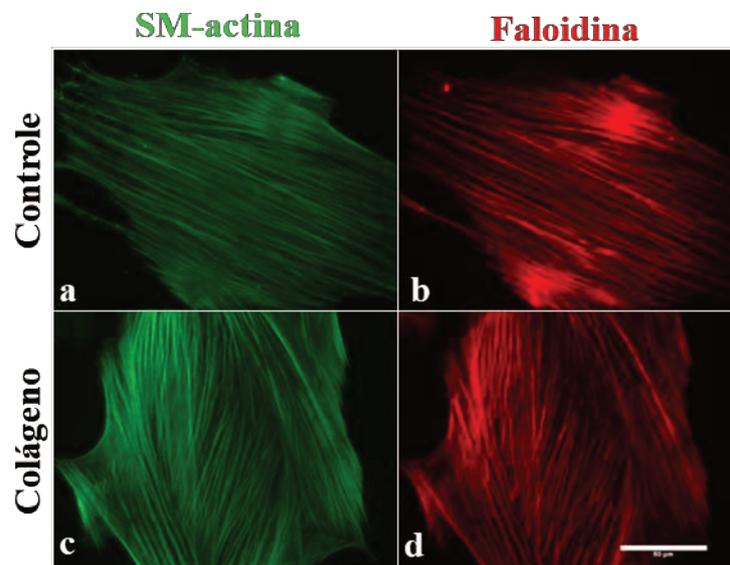


Figura 2. Imunofluorescência para SM-actina e marcação com Faloidina-TRITC. As CMLs controle (sem substrato) (a-b) e sobre colágeno tipo I (c-d), apresentaram similaridades na marcação. Barra de escala: 50 μm .

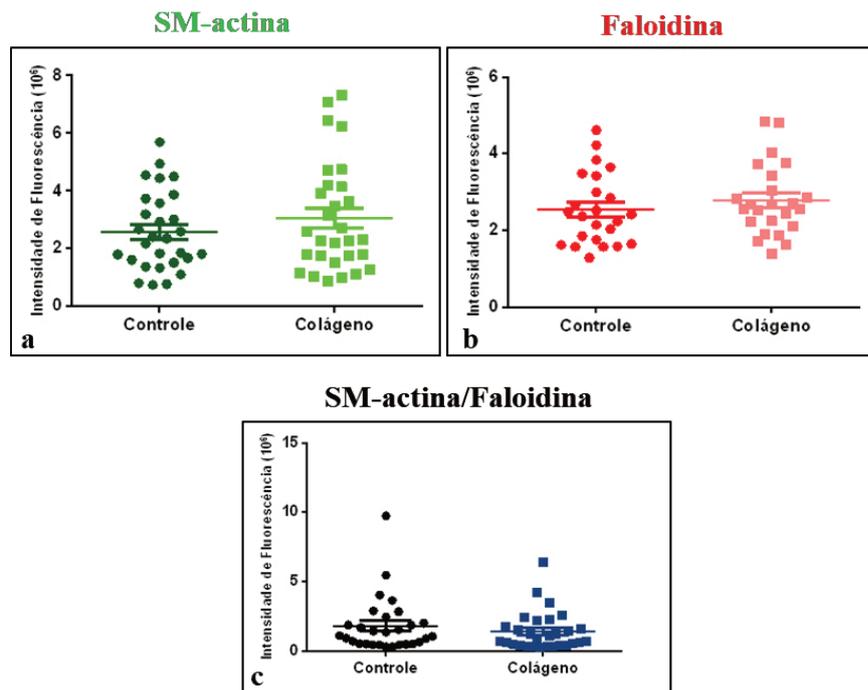


Figura 3. Intensidade de fluorescência das CMLs após 48 h em cultura. Marcação com SM-actina (a) e Faloidina-TRITC (b). Não há diferença na intensidade de fluorescência nas duas condições, nem na relação SM-actina/Faloidina (c) (n = 30).

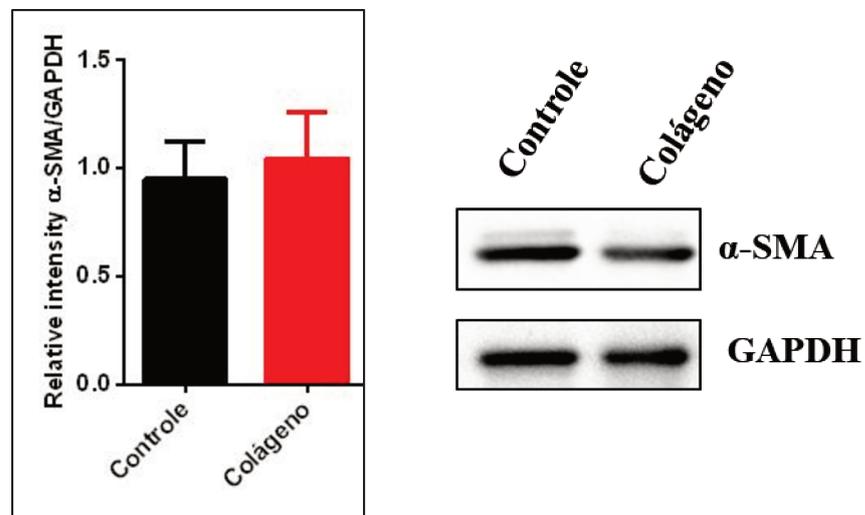


Figura 4. Western blotting para SM-actina, após 48 h de cultura. Não há diferença significativa na quantidade de SM-actina nas CMLs semeadas nas duas condições (n = 4).

2.2 FAK nas CMLs

Não há diferenças na quantidade de FAK total, nem de sua forma fosforilada FAKpY397 após 7 e 48 h de cultura nas CMLs controle e sobre colágeno.

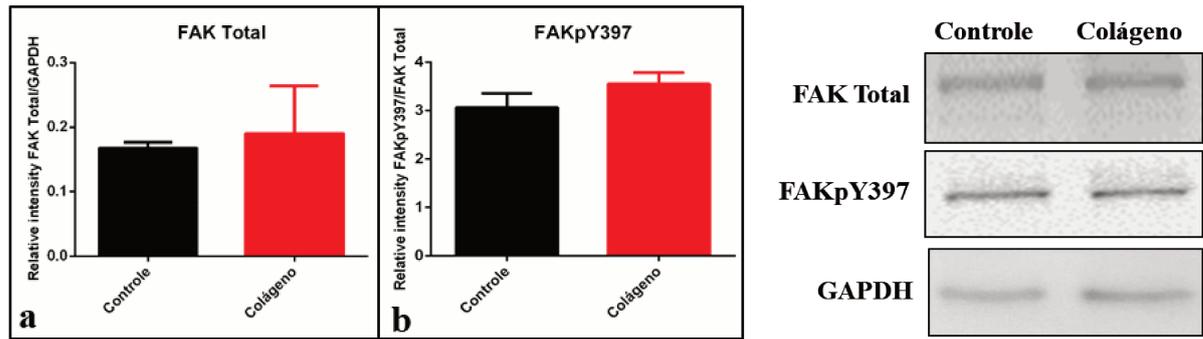


Figura 5. Western blotting para FAK total e FAKpY397 após 7 h em cultura. Não há diferenças significativas na quantidade de FAK e sua forma fosforilada nas duas condições (n = 4).

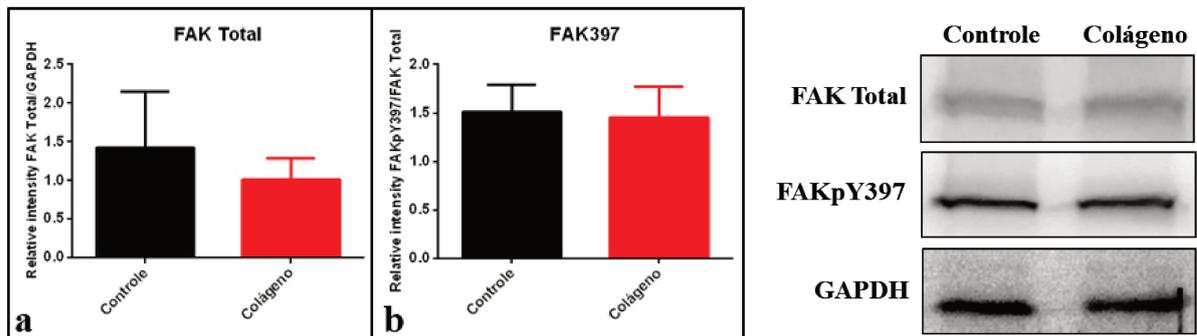


Figura 6. Western blotting para FAK total e FAKpY397 após 48 h em cultura. Não há diferenças significativas na quantidade de FAK e sua forma fosforilada nas duas condições (n = 4).

2.3 Inibição de ROCK, Rac e Cdc42 nas CMLs semeadas sobre o colágeno tipo I

A adição do inibidor de ROCK em diferentes concentrações não teve efeito na adesão das células (Fig. 7e-p), mas sim na morfologia e organização do citoesqueleto na concentração de 100 μ M (Fig. 7m-p e 8c). O inibidor de Rac a uma concentração de 1 μ M (Fig. 9a-d) não teve efeito na adesão, enquanto que numa concentração 10 vezes maior (Fig. 9e-h), algumas células não aderiram, enquanto que aquelas que aderiram rapidamente, perderam suas adesões após 7 h. Na presença do inibidor de Cdc42 a uma concentração de 1 μ M, não teve efeito na adesão das células (Fig. 10a-d). Na concentração 10 μ M, algumas células não se aderiram e, aquelas que conseguiram aderir-se nos primeiros minutos de cultura sobre o colágeno, perderam suas adesões após 3 h (Fig. 10e-h).

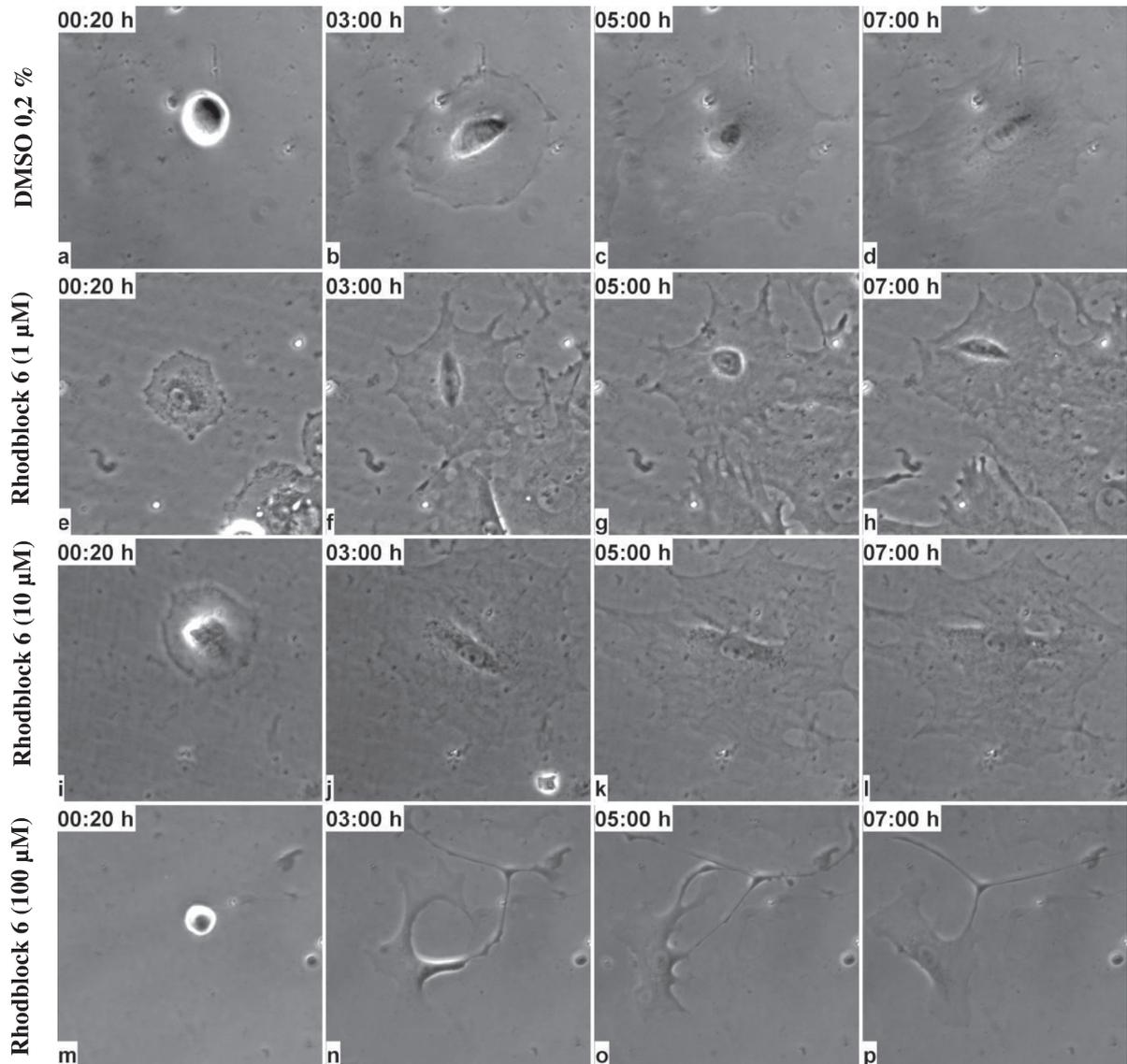


Figura 7. CMLs semeadas sobre colágeno na presença do inibidor de ROCK, durante 7 h de cultura. CMLs com DMSO 0,2% (a-d). Rhodblock 6 1 μ M (e-h) e 10 μ M (i-l) não teve efeito na adesão das células. Rhodblock 6 100 μ M (m-p) não inibiu a adesão, mas a morfologia das células foi alterada, caracterizando-se pela presença de uma longa cauda (n-p).

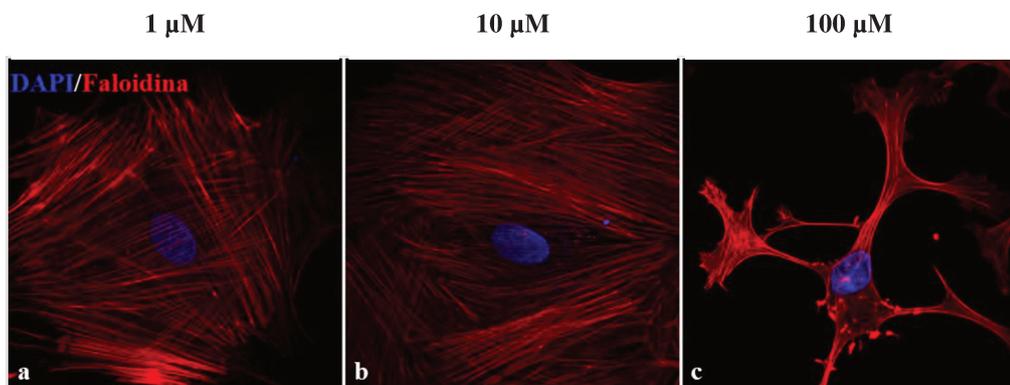


Figura 8. Marcação do citoesqueleto de actina com Faloidina-TRITC após 7 h em cultura com o inibidor de ROCK. As concentrações de 1 e 10 μ M (a-b) do Rhodblock 6 não alteram a organização do citoesqueleto nem a morfologia nas CMLs semeadas sobre colágeno tipo I. Uma concentração de 100 μ M (c) de Rhodblock 6 altera o padrão de organização do citoesqueleto e a morfologia das células.

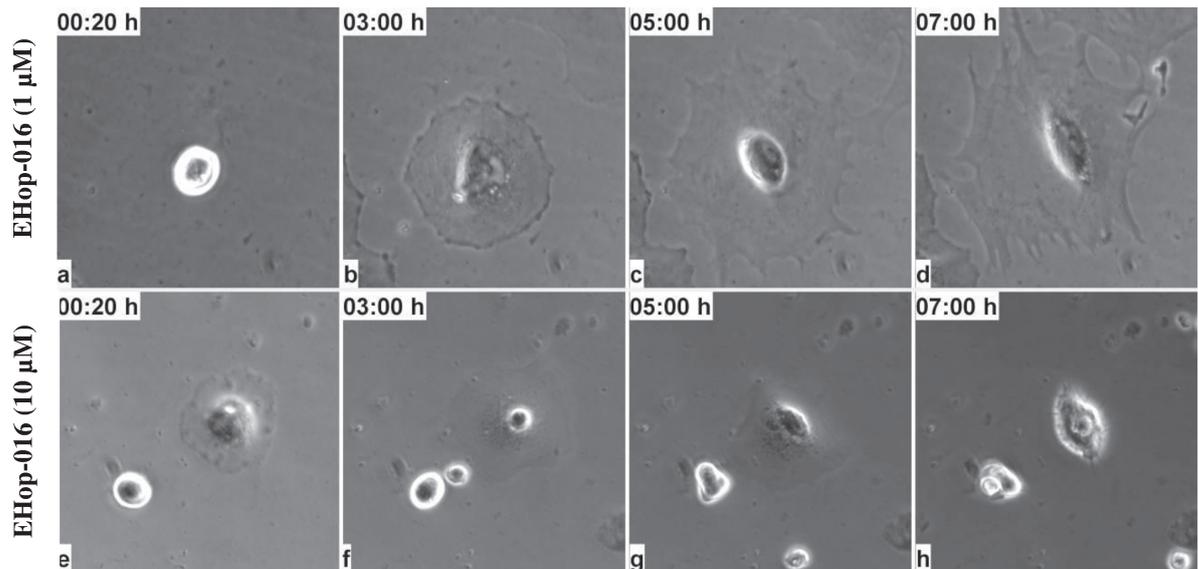


Figura 9. CMLs semeadas sobre colágeno tipo I na presença do inibidor de Rac 1 e 3, após 7 h de cultura. EHop-016 1 μ M (a-d) não teve efeito na adesão das células. Em contraste, EHop-016 10 μ M (e-h) levou à desmontagem das adesões.

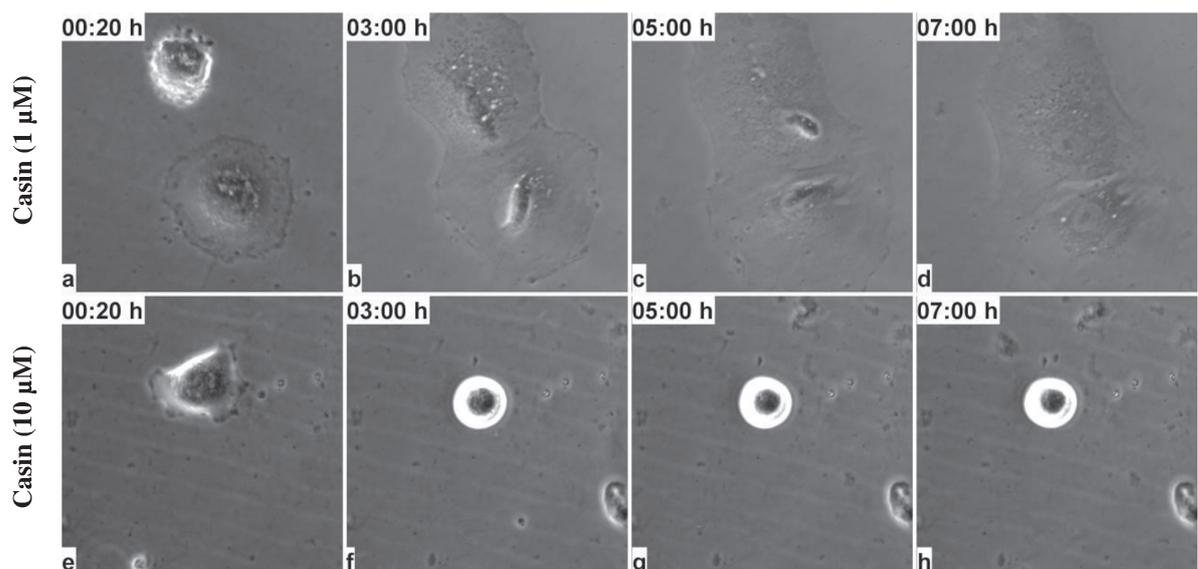


Figura 10. CML semeadas sobre colágeno tipo I na presença do inibidor de Cdc42, após 7 h de cultura. Casin 1 μ M (a-d) não teve efeito na adesão das células. Em contraste, Casin 10 μ M (e-h) levou rapidamente à desmontagem das adesões.

2.4 Organização do Citoesqueleto e Espalhamento

Na ausência de componentes de MEC, as células apresentaram maior actina cortical sem a formação de fibras de estresse como no colágeno (Fig. 11a-b). Levando em consideração as observações na seção anterior, o inibidor de ROCK (Rhodblock 6) a uma concentração de 100 μ M não impediu as células de se aderirem ao colágeno. Nesta concentração, a morfologia das CMLs e organização do citoesqueleto de actina foi alterada (Fig. 7m-p e Fig. 11c) onde se

evidenciam pequenos feixes ao longo da célula e com acúmulo nas regiões de adesão. As CMLs somente sobre colágeno apresentaram os maiores valores de área. O tratamento com o Rhodblock 6 desencadeia alterações morfológicas, após 7 h de cultura (Fig. 12).

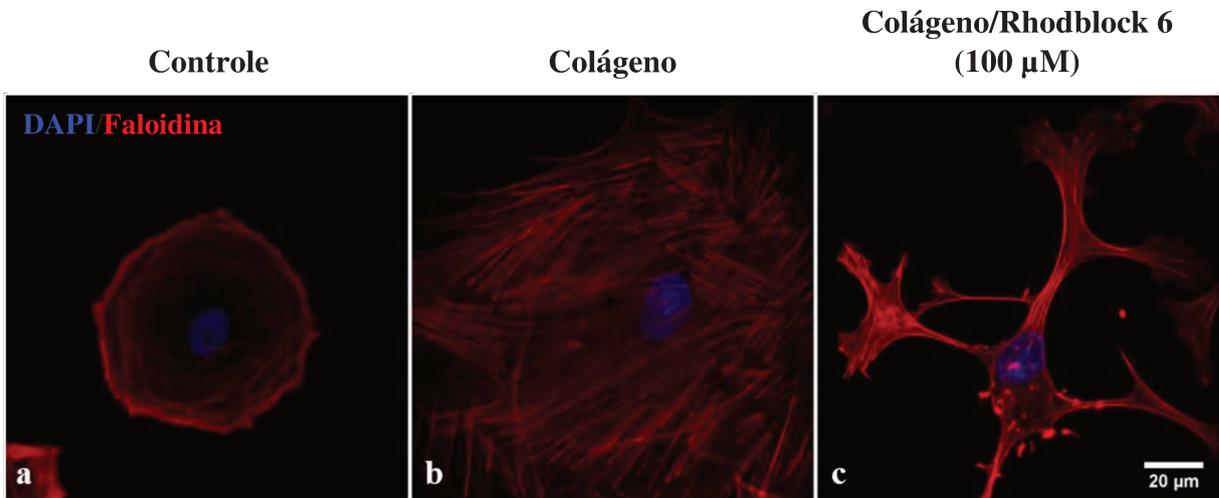


Figura 11. Organização do citoesqueleto de actina nas CMLs após 7 h de cultura. Células controle (na ausência de componentes de MEC) (a). Células sobre colágeno tipo I (b). Células sobre colágeno tipo I e na presença do inibidor Rhodblock 6 (100 μM) (c).

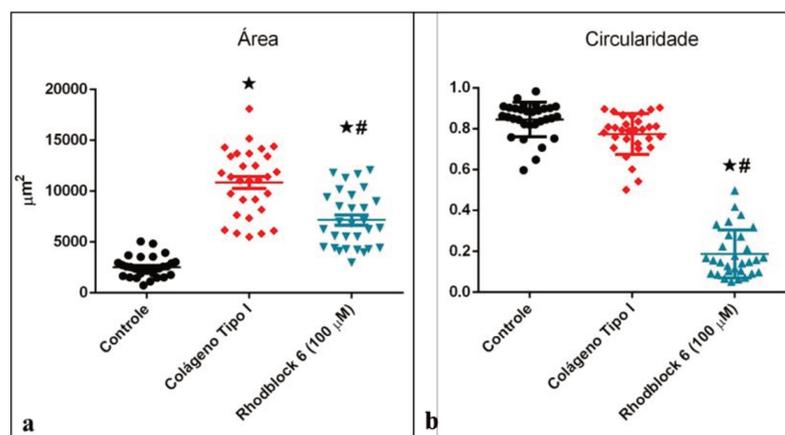


Figura 12. Análise morfométrica após 7 h de cultura. Células sem substrato (controle) são menores que aquelas semeadas sobre colágeno (a). A presença do inibidor Rhodblock 6 nas CMLs que foram semeadas sobre colágeno levou a uma morfologia mais alongada destas (b). (n = 30). Circularidade (Valores próximos a 1 e próximos a 0 uma indicam uma morfologia circular e alongada, respectivamente). (*) diferença com o controle. (#) diferença com o colágeno.

2.5 Adesões focais

Para observar o efeito da inibição de ROCK nas adesões, começamos olhando nas células que estavam aderidas após 24 h de cultura. A marcação com α -actinina mostrou a presença de adesões nas células sem substrato e com colágeno tipo I (Fig. 13). Após 7 h de cultura, nas células controle (Fig. 14a-c), a marcação foi bastante acentuada em algumas regiões

da membrana celular e com presença no citoplasma. No colágeno (Fig. 14d-f), a marcação de α -actinina foi localizada no citoplasma e nas adesões focais, que neste tempo eram bastante notórias, onde interagem com os filamentos de actina. A inibição de ROCK provocou grandes agregados de α -actinina principalmente na cauda da célula (Fig. 14g-i).

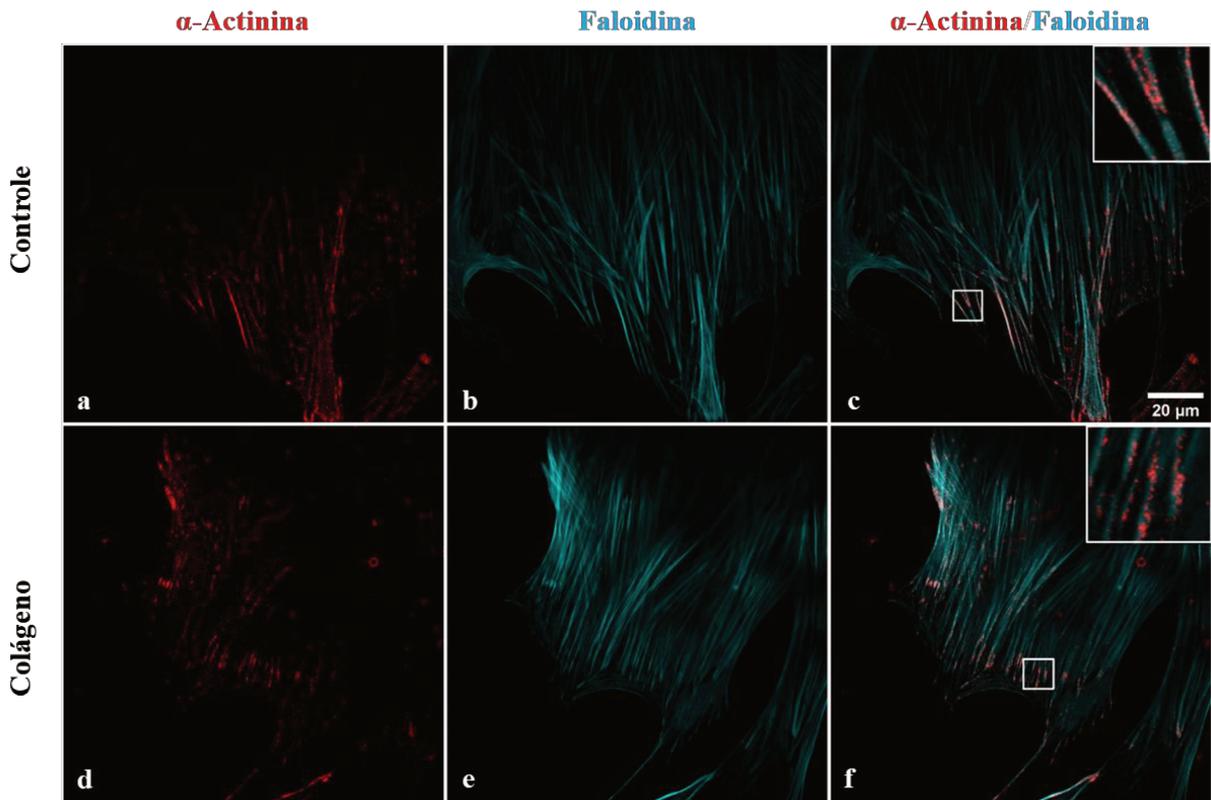


Figura 13. Imunofluorescência nas CMLs após 24 h em cultura. α -actinina estava presente nas adesões das células controle (a-c) e nas sementeas sobre colágeno tipo I (d-f).

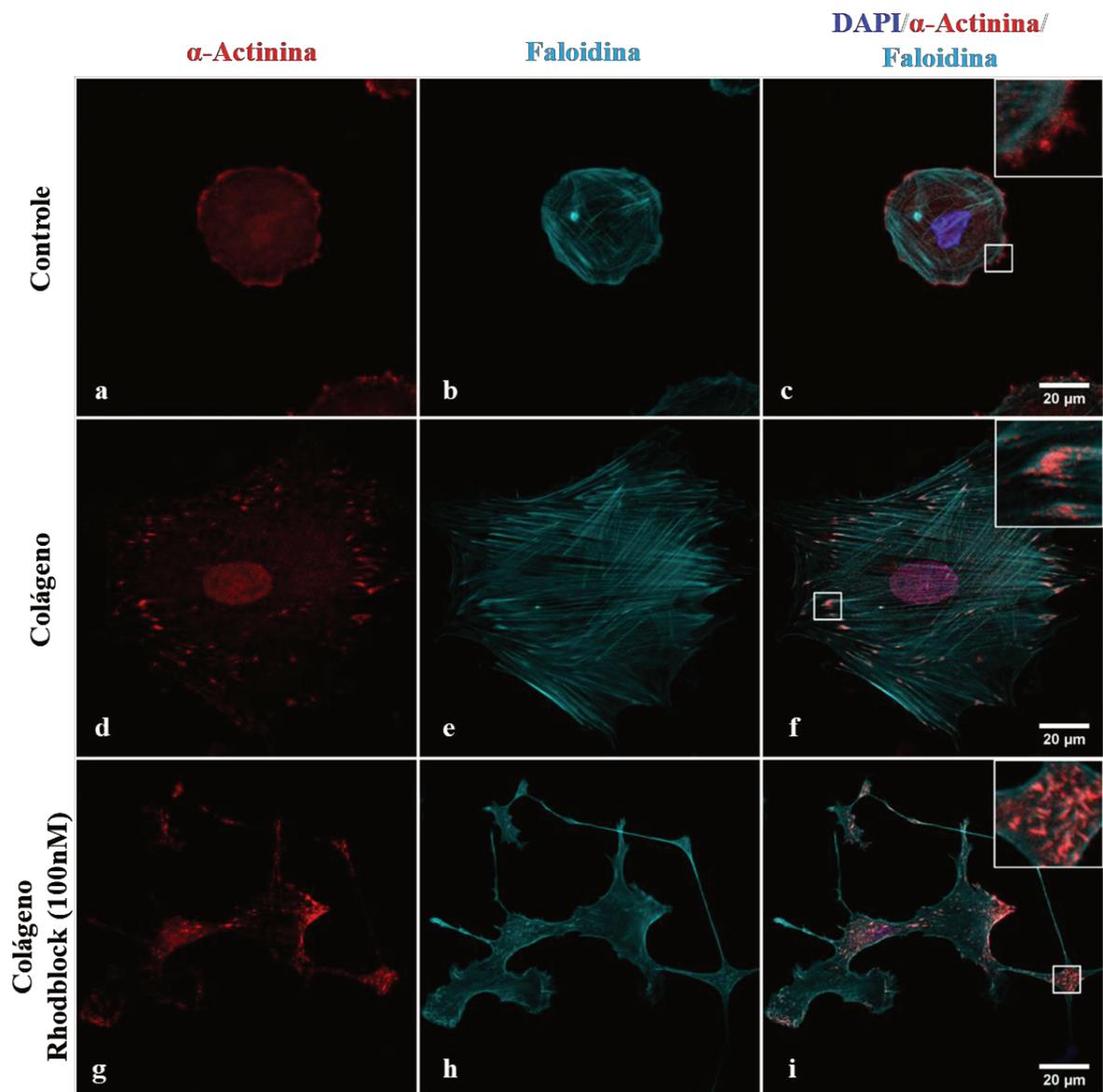


Figura 14. Imunofluorescência nas CMLs após 7h de cultura. Nas células controle (a-c), sobre colágeno (d-f) e sobre colágeno somada a presença do inibidor de ROCK (g-i).

2.5 Marcadores do fenótipo contrátil nas CMLs

Após 7 h de cultura, as CMLs que foram semeadas sobre colágeno apresentaram uma alta expressão para MYH11 (Fig. 15b). Enquanto, sobre colágeno adicionado à presença do inibidor de ROCK, a expressão de ACTA2 e MYH11 diminuíram (Fig. 15a-b). A expressão de *Smoothelin* não foi afetada após esse tempo nas diferentes condições (Fig. 15c).

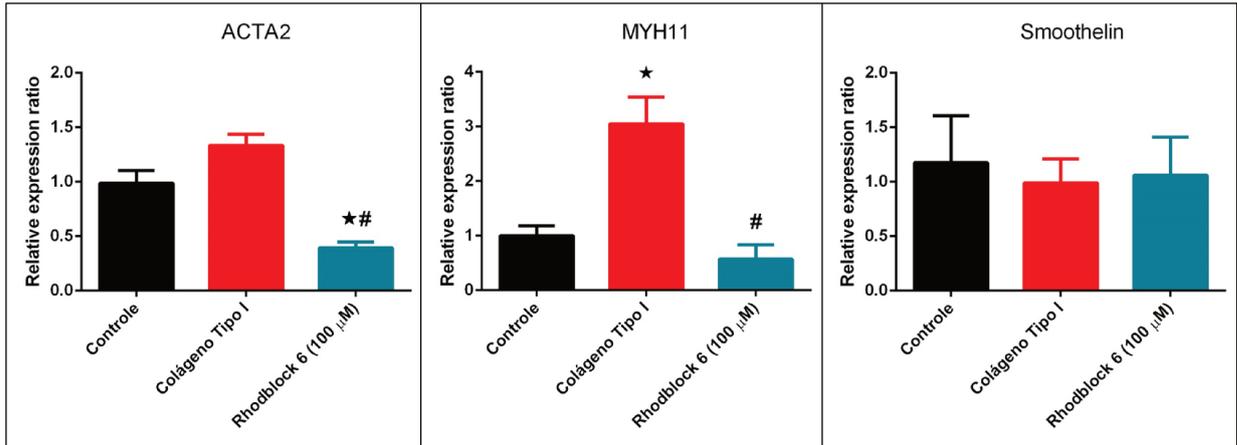


Figura 15. RT-PCR para alguns dos genes relacionados ao fenótipo contráctil. O tratamento com inibidor de ROCK diminuiu a expressão de ACTA2 e MYH11 nas CMLs sobre colágeno (a-b). Só o colágeno gerou uma maior expressão de MYH11. *Smoothelin* não apresentou diferenças significativas nas diferentes condições (n=3). (*) diferença com o controle. (#) diferença com o colágeno.

2.6 Trajetória de Migração

Após 7 h de cultura, as CMLs na ausência de substrato (controle) e aquelas semeadas somente sobre colágeno, apresentaram mudanças no centro geográfico da célula sem levar a uma migração propriamente dita. Em média, elas se movimentaram $17,24 \pm 1,3 \mu\text{m}$ e $20,64 \pm 1,2 \mu\text{m}$ no controle e no colágeno, respectivamente. O tratamento com o inibidor de ROCK das células semeadas sobre colágeno, estimulou o deslocamento e migração das células que migraram em média $62,12 \pm 3,3 \mu\text{m}$ (Fig. 16 e Fig. 17).

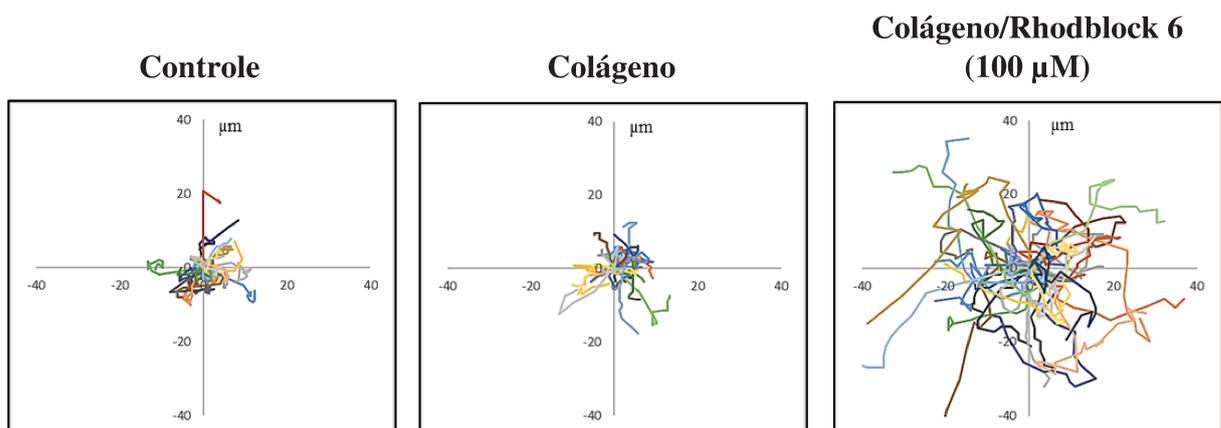


Figura 16. Trajetória de migração das CMLs após 7 h de cultura. Células sem substrato (controle) e sobre colágeno se deslocam pouco do seu centro. Enquanto que aquelas semeadas sobre colágeno somada a presença do inibidor migraram. Cada linha mostra a trajetória de uma única célula. (n = 30).

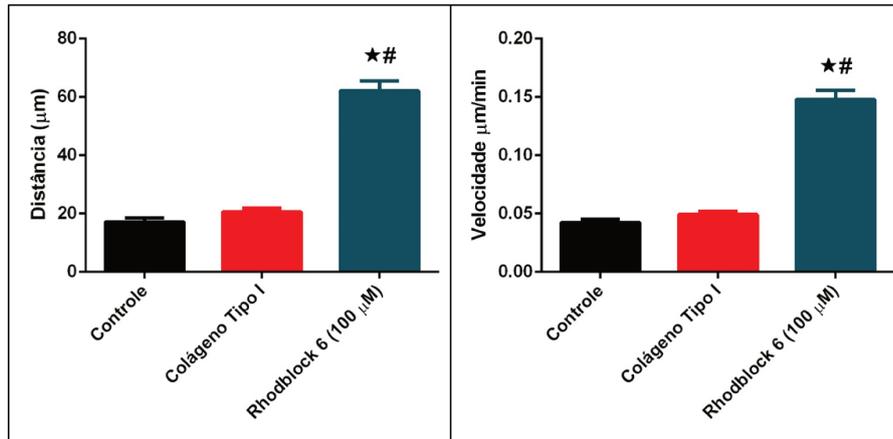


Figura 17. Distância e velocidade das CMLs após 7 h de cultura. As células semeadas sobre colágeno somada à presença do inibidor de ROCK se deslocam e migram mais que na ausência de substrato (controle) ou com somente colágeno. (*) diferença com o controle. (#) diferença com o colágeno.

2.7 Teste de Migração (*wound healing assay*)

Com a finalidade de observar o efeito do inibidor de ROCK na migração de células já aderidas à superfície, CMLs foram semeadas na ausência de colágeno e filmadas por 24 h. O inibidor de ROCK estimulou a migração das células e, por consequência, ocasionou a redução da área da ferida após 8, 16 e 24 h. As células continuaram apresentando uma morfologia alongada com longas caudas ao passo que se movimentavam (Fig. 18 e Fig. 19).

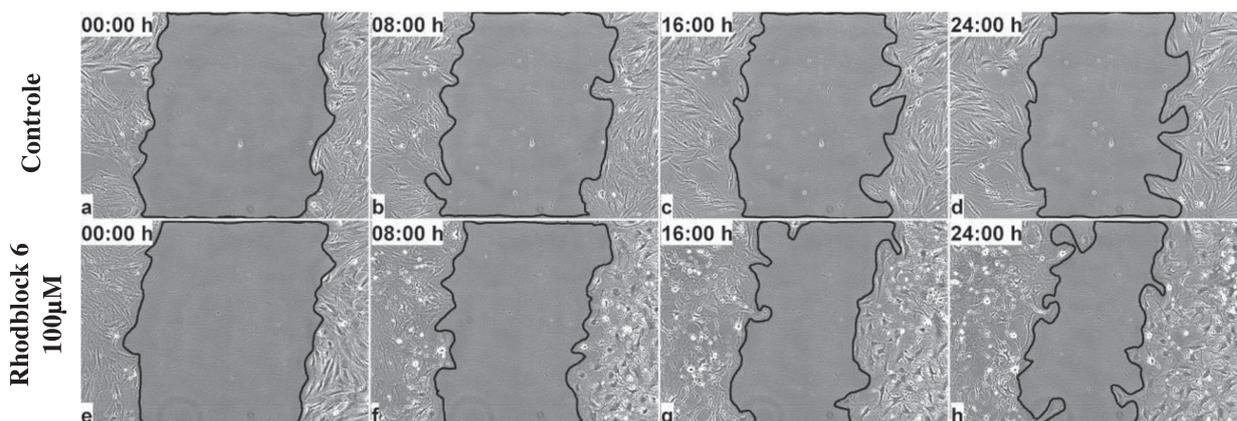


Figura 18. Teste de migração (*wound healing assay*). As CMLs foram semeadas sem substrato (a-h). O tratamento com o inibidor de ROCK estimulou a migração diminuindo assim a área inicial da ferida. Imagens adquiridas com objetiva de 10X.

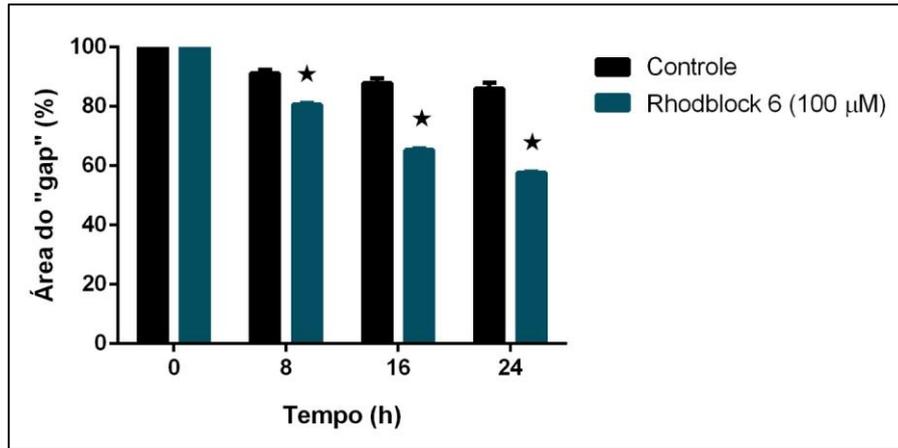


Figura 19. Comparação na redução da área do “gap” em 8, 16 e 24 h após realizado o risco na monocamada conflente. O tratamento com inibidor de ROCK estimulou a migração das células e, conseqüentemente, a redução da área inicial da ferida (n = 3).

3. Discussão

No capítulo I observamos que as CMLs de explante de próstata semeadas sobre colágeno tipo I se aderem rapidamente a este substrato e apresentam valores de área e perímetro maiores que aquelas semeadas na ausência de matriz. Embora as diferenças morfológicas durante as primeiras horas de cultura sejam notórias, estas já não são bem evidenciadas após 48 h, pois as CMLs apresentaram morfologia, organização do citoesqueleto, conteúdo de SM-actina e ativação da FAK semelhantes. Eventos que poderiam ser explicados pela presença de componentes de MEC presentes no SFB que favorecem a adesão das células. 48 h seria um tempo suficiente para que as células semeadas sem substrato pudessem adaptar e organizar seu citoesqueleto semelhante a aquelas semeadas no colágeno tipo I (Hayman et al., 1985).

O colágeno tem sido usado como *scaffold* em processos de engenharia de tecidos por sua fácil obtenção e a capacidade de estimular a adesão de diferentes tipos celulares incluindo células tronco mesênquimais (Drury and Mooney, 2003; Somaiah et al., 2015) e CMLs, como apresentado neste trabalho. As células se aderem ao colágeno através das integrinas que são receptores transmembrana. A ligação ao colágeno é mediada pelas integrinas $\alpha1\beta1$ e $\alpha2\beta1$ que reconhecem o motivo GFOGER presente no colágeno (Heino, 2014; Huttenlocher and Horwitz, 2011). Proteínas adaptadoras que interagem com o domínio citoplasmático das integrinas se conectam com o citoesqueleto de actina, que por sua vez interagem com o complexo LINC regulando a expressão gênica em resposta a componentes específicos de MEC (Alam et al., 2016).

Fibroblastos de pâncreas semeados sobre colágeno expressam maiores níveis de SM-actina que se organiza em grandes feixes (Stylianou et al., 2019). Nas CMLs de próstata após 7 h em cultura, o colágeno estimulou a rápida organização do citoesqueleto de actina em fibras de estresse e as células apresentavam adesões focais bem definidas, que não eram observadas na ausência de MEC. Isso ressalta a importância do colágeno na organização do citoesqueleto de actina formando grandes feixes nas CMLs de próstata.

As proteínas Rho GTPases regulam a formação de filamentos de actina e participam como interruptores moleculares envolvidos na migração celular. O uso de inibidores de proteínas Rho tem sido usado para estudar os efeitos do bloqueio dessa via de sinalização em diferentes tipos celulares. O ácido lisofosfatídico (LPA) tem sido amplamente usado para ativar a sinalização através de Rho-ROCK. A inibição de ROCK tem efeito negativo na migração das CMLv (Ai et al., 2001). Em células endoteliais a inibição provocou mudanças no citoesqueleto

e perda das adesões focais e aumento da migração (Breyer et al., 2012). Desencadeia também alterações na morfologia (Cheng et al., 2017), perda de adesões na periferia da célula e diminuição da fibras de estresse (Meekins et al., 2016). Além disso, uma prolongada exposição ao inibidor de Rho pode provocar apoptose nas células (Liu et al., 2002). Esses efeitos podem ser revertidos colocando um novo meio de cultura sem inibidor (Katoh et al., 2001). O tratamento com o inibidor de ROCK durante 7h provocou alterações nas CMLs de próstata similares às descritas anteriormente.

Uma característica evidente das CMLs de próstata após o tratamento com o inibidor de ROCK é a presença de uma longa cauda, efeito da inibição da contração a qual é indispensável para a desmontagem das adesões no eixo posterior da célula. Efeitos similares foram observados em fibroblastos, associados à falta de contração na célula que é regulada pela MLC (cadeia leve da miosina) (Totsukawa et al., 2004).

Neste trabalho observamos que Rac e Cdc42 são importantes para a adesão das células e que uma concentração de 10 μ M do inibidor EHop-016 e Casin foi suficiente para impedir as células de aderirem ao colágeno, como foi apresentado no capítulo I, demonstrando que essas células aderem rapidamente a este substrato. Estas GTPases tem sido alvo de pesquisas para o desenvolvimento de fármacos durante o tratamento do câncer, especialmente tem sido demonstrado que o tratamento com EHop-016 pode reduzir o tamanho do tumor, a capacidade de invasão e a angiogênese (Castillo-Pichardo et al., 2014; Maldonado and Dharmawardhane, 2018). Estas proteínas também estão implicadas na transição epitélio-mesênquima (Maldonado and Dharmawardhane, 2018), evento que acontece durante a progressão do câncer de próstata (Odero-Marah et al., 2018), servindo como alvo para o tratamento.

Embora tenha sido mais estudado o papel da GTPases na migração das células, esta não é a única função que desempenham, pois também estão relacionadas na modulação fenotípica das CMLs. A sinalização através de Rho-ROCK é importante para a diferenciação da CMLs, já que aumenta a expressão de marcadores do fenótipo contrátil (Kolyada et al., 2003; Worth et al., 2004). Nossos resultados demonstram que o bloqueio de Rho em um período de 7h de exposição desencadeia uma diminuição significativa dos marcadores do fenótipo contrátil ACTA2 e MYH11. Assim a via de sinalização RhoA-ROCK favorece formação de fibras de estresse e por sua vez o estado contrátil da célula, que é característica do fenótipo contrátil.

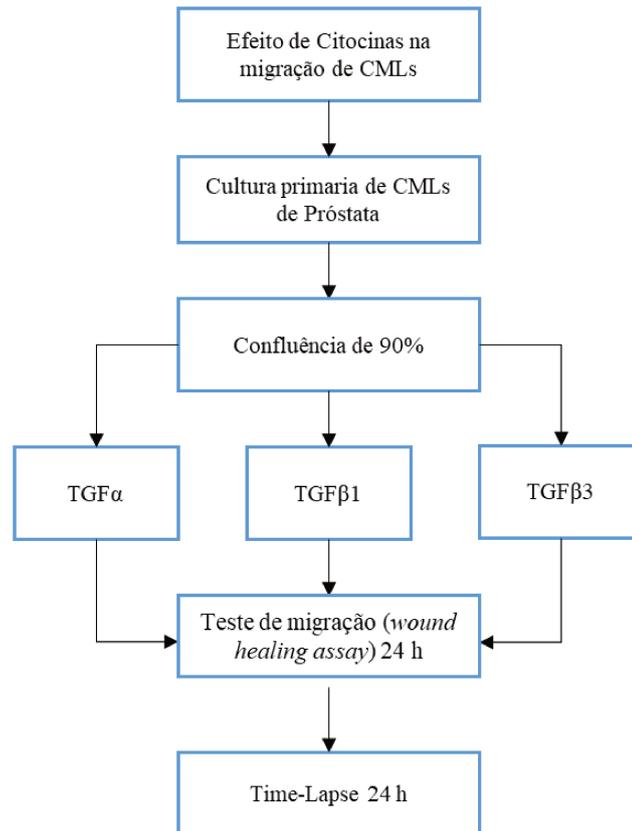
4. Conclusões

- Rac e Ccd42 são indispensáveis para a adesão das CMLs sobre o colágeno.
- Inibição da ROCK não impede que as CMLs se aderirem ao colágeno.
- Inibição da ROCK induz migração das CMLs semeadas sobre o colágeno.
- Inibição da ROCK afeta a organização do citoesqueleto e distribuição das adesões nas CMLs semeadas no colágeno.
- Inibição da ROCK está associada a diminuição das proteínas envolvidas na contração da célula.

CAPÍTULO IV

Efeito do TGF α , do TGF β 1 e do TGF β 3 na migração das CMLs

Neste capítulo estudamos o efeito das citocinas TGF α , TGF β 1 e TGF β 3 na migração das CMLs, já que essas citocinas estão presentes no soro, após a formação da malha de fibrina e regulam a migração das células dérmicas durante o processo de cicatrização.



Esquema ilustrativo que resume a metodologia utilizada e sua finalidade neste capítulo.

1. Material e métodos

1.1 Teste de migração (*wound healing assay*) nas CMLs

A obtenção e cultura de CMLs a partir de explantes de próstata ventral de ratos segue a mesma metodologia usada no capítulo I item 1.1. Posteriormente, foram semeadas 30000 células/poço (placa de 24 poços) até atingir 90% de confluência. As células foram mantidas *overnight* em meio de cultura sem SFB e, posteriormente, foi feito um “risco” sobre a monocamada de células usando ponteira (200 μ L) de micropipeta. Posteriormente, as células removidas foram retiradas após lavagem com PBS e as células aderidas foram mantidas com meio de cultura suplementado com 1% de SFB. Nessa condição foram adicionadas as citocinas

(Tabela 1), em experimentos independentes. A quantificação da área de migração foi feita a cada 8 h, por um intervalo total de 24 h.

Citocina	Fabricante/Catálogo	Concentração (ng/mL)
TGF α	PeptoTech/100-16A	0,1 - 0,3 - 0,5 - 10 - 30 - 50
TGF β 3	PeptoTech/100-36E	1 - 3 - 5
TGF β 1	PeptoTech/100-21-2UG	10 - 30 - 50

Tabela 1. Citocinas e concentrações utilizadas nos experimentos de migração

1.2 Análises de imagens

A análise das imagens foi realizada usando o software ImageJ (Fiji). A área do risco no tempo 0 h foi considerada como 100% e a redução dessa área no decorrer do tempo foi quantificada nos diferentes grupos.

1.3 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 6. Os dados foram analisados usando o teste ANOVA com pós teste de comparação. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM).

2. Resultados

No tempo 0 h a área foi considerada como 100% e a redução através do tempo foi mensurada. As CMLs na presença do TGF α apresentaram um maior índice de migração que os outros grupos. Após 16 h em cultura, houve uma diminuição significativa da área inicial que continuou até as 24 h (Fig. 1e-l e Fig. 2a-b). Em 24 h, as concentrações de 0,1 e 0,3 ng/mL de TGF α apresentaram maior redução da área inicial com valores de $34\pm 6 \mu\text{m}^2$ e $29\pm 2 \mu\text{m}^2$, respectivamente, quando comparados com o controle ($64\pm 9 \mu\text{m}^2$) (Fig. 1e-h e Fig. 2a). Nas concentrações de 1 e 3 ng/mL de TGF β 3, não foram observadas diferenças significativas na redução da área decorridas 24 h (TGF β 3 1 ng/mL: $72\pm 2 \mu\text{m}^2$ e TGF β 3 3 ng/mL: 67 ± 2) quando comparados com o controle ($71\pm 0,1 \mu\text{m}^2$) (Fig. 1m-p e Fig. 2c), enquanto na concentração de 5 ng/mL houve uma redução significativa somente decorridas 24 h ($62\pm 3 \mu\text{m}^2$) (Fig. 1m-p e Fig. 2c). O TGF β 1 não apresentou diferenças na migração das CMLs quando comparado com o grupo controle (Fig. 1q-t e Fig. 2d).

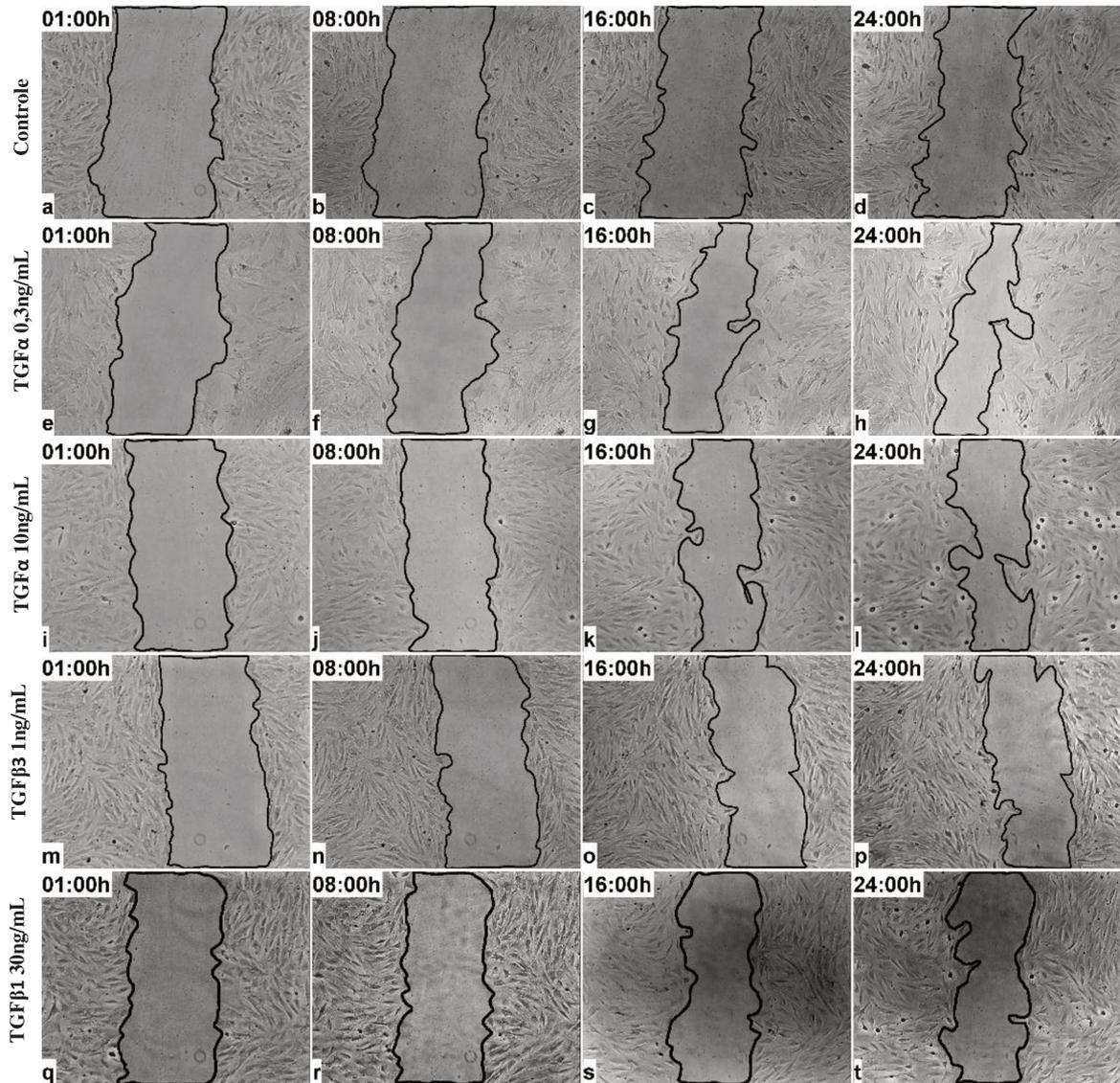


Figura 1. Teste de migração (*wound healing assay*). CMLs na ausência de fatores migratórios (controle) (a-d). CMLs expostas ao TGF α 0,3 (e-h) e 10 ng/mL (i-l) apresentaram uma redução na área inicial. CMLs expostas a TGF β 3 1 ng/mL (m-p) e TGF β 1 30 ng/mL (q-t) não apresentaram diferença na migração quando comparado com o controle. Imagens adquiridas com objetiva de 10X.

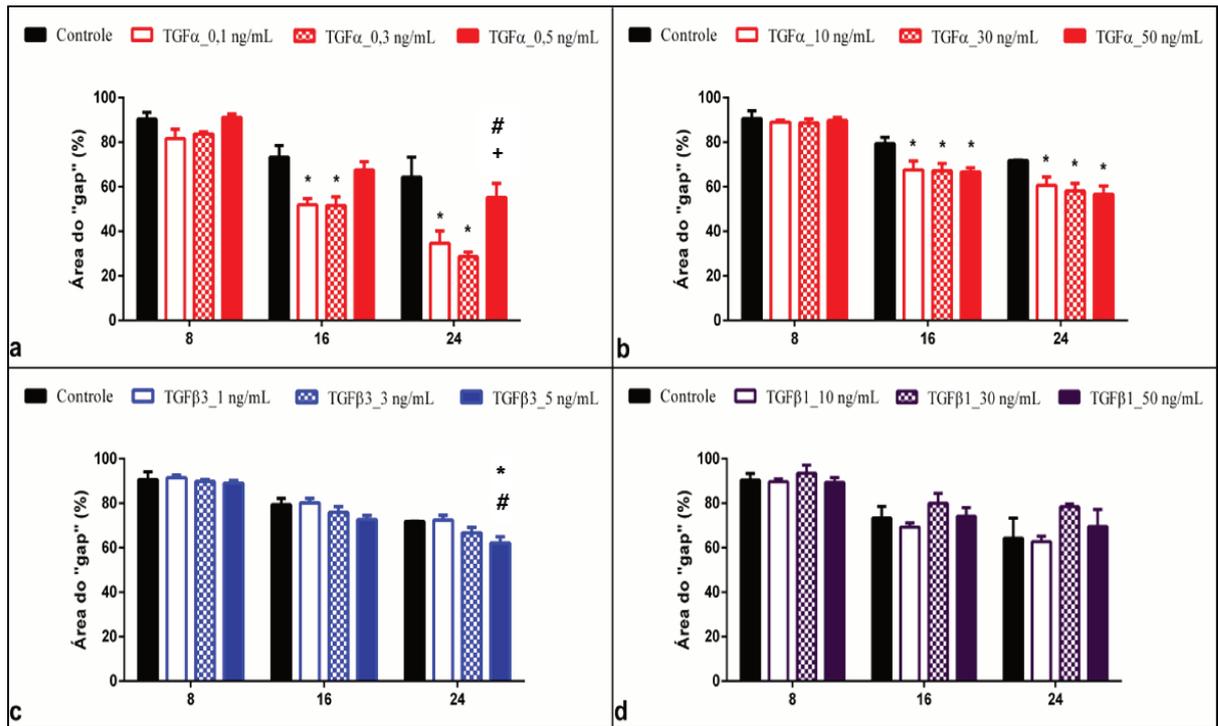


Figura 2. Comparação na redução da área em 8, 16 e 24 h após realizado o risco na monocamada confluenta. CMLs na ausência de fatores migratórios (controle) estão indicadas em **preto (a-d)**. TGF α (0,1 e 0,3 ng/mL) apresentaram diferença com o controle em 16 e 24h (a). TGF α em altas concentrações (10, 30 e 50 ng/mL) apresentaram diferença com o controle em 16 e 24h (b). TGF β 3 concentrações de 1 e 3 ng/mL não tem diferença com o controle. Enquanto que na concentração de 5 ng/mL decorridas 24 h há uma redução significativa na área do risco (c). TGF β 1 não apresentou diferença com o controle (d). (n = 3).

3. Discussão

A família TGF β (*Transforming growth factor- β*) abrange vários fatores incluído os TGF β s, BMPs (*bone morphogenetic proteins*), Nodal, Activin entre outros que regulam processos como proliferação, diferenciação, migração e apoptose (Derynck and Budi, 2019). Os receptores (T β RI e T β RII) são transmembrana e seu domínio citoplasmático contém um domínio catalítico (com atividade Serina/Treonina quinase). Acredita-se que o receptor do tipo II está constitutivamente ativo, assim, uma vez ocorrida a união ligante-receptor, o receptor do tipo II fosforila o receptor do tipo I permitindo a propagação do sinal através da fosforilação das proteínas Smad. As Smads são subdivididas em 3 classes funcionais: R-Smad, Co-Smad e I-Smad (Massague, 2000). As R-Smad são ativadas pelo receptor tipo I que, posteriormente, se associam com a Co-Smad. O resultado é a formação de um dímero ou trimero de R-Smad-Co-Smad, o qual é traslocado ao núcleo. O complexo de Smad no núcleo se liga ao DNA e junto com outros fatores de transcrição regula a expressão de genes. As Smad inibitórias, regulam negativamente a sinalização TGF β por competição com as R-Smad pelos receptores ou a interação com as Co-Smad. Além disso, as I-Smad podem desencadear a degradação dos receptores (Massague, 2000; Massague, 2012; Massague and Chen, 2000; Shi and Massague, 2003).

As 3 isoformas do TGF β têm sido identificadas na próstata, apresentando diferenças de expressão no tecido normal adulto e durante a progressão tumoral (Gerdes et al., 1998b; Perry et al., 1997). Ausência do T β RI, do T β RII e diminuição na expressão do TGF β 3, na próstata está relacionada a processos malignos (Danielpour, 2005; Djonov et al., 1997; Gerdes et al., 1998b).

Os andrógenos desempenham funções importantes para o desenvolvimento, maturação e homeostase na próstata. Após a privação androgênica, há uma alta expressão dos ligantes TGF β , dos seus receptores e ativação das Smads, que estão envolvidos na apoptose das células epiteliais (Lee et al., 1999). Assim, durante o primeiro dia após a castração, foi identificado um aumento de 10 vezes no RNAm para o TGF β que, junto com seus receptores, atingem o pico máximo de expressão no 4º dia. O tratamento com reposição de andrógeno diminui significativamente os níveis do RNAm para TGF β quase a valores semelhantes aos observados na próstata normal, indicando que essa citocina está regulada pela presença desse hormônio (Kyprianou and Isaacs, 1988; Kyprianou and Isaacs, 1989).

Um dos efeitos mais conhecidos do TGF β nas CMLs é capacidade de diferenciação, mais especificamente o TGF β 1, pois estimula um aumento na expressão de SM-actina. Nas CMLs de próstata, o TGF β 1 desencadeia uma redistribuição subcelular do AR (receptor de andrógenos) do núcleo ao citoplasma e inibição da proliferação, efeitos que não são observados com o TGF β 2 (Gerdes et al., 1998a; Gerdes et al., 2004). Nossos dados mostraram que o TGF β 1 e TGF β 3 não alteraram a migração das CMLs em comparação com o grupo controle, corroborando com estudos anteriores de que o TGF β 1 está envolvido com a diferenciação celular e não com a migração, que é uma característica de CMLs indiferenciadas.

O TGF α pertence à família do EGF (*Epidermal Growth Factor*) e se liga ao seu receptor (EGFR) presente na membrana plasmática induzindo a dimerização deste como homo ou heterodímeros. O domínio citoplasmático tem atividade de tirosina quinase. Após a ativação, as proteínas Grb2 e Sos se ligam diretamente ao receptor, desencadeando mudanças conformacionais na proteína Sos que, posteriormente, recruta a Ras, responsável por ativar Raf-1. A cascata de sinalização termina com a ativação da ERK, através de ativação de MAPK. As proteínas quinases têm como alvo outras proteínas efetoras que atuam como fatores de transcrição, que podem movimentar-se ao núcleo e regular a expressão de genes (Jorissen et al., 2003).

Na próstata adulta normal, o EGFR encontra-se localizado nas células epiteliais, não obstante, seu ligante, o TGF α , está exclusivamente nas CMLs (Leav et al., 1998). *In vitro*, a testosterona aumenta a expressão do TGF α e do seu receptor, indicando uma forte relação entre o hormônio e essa citocina, pois através da produção do TGF α há um aumento na proliferação de células cancerosas (Wilding et al., 1989). *In vivo*, a próstata com hiperplasia e com carcinoma apresentam níveis elevados de TGF α e do EGFR. O aumento da citocina como do receptor podem levar ao aumento na proliferação e transformação celular para um fenótipo maligno (Ching et al., 1993). O TGF α também estimula as CMLs para um fenótipo sintético, no qual elas são mais proliferativas e adquirem capacidade migratória, enquanto o TGF β induz a diferenciação adquirindo mais componentes do citoesqueleto envolvidos com a contração (Guo and Chen, 2012; Stamatiou et al., 2012). CMLs de explantes de próstata tratadas com TGF α apresentam uma maior migração que aquelas sem a presença desse fator, sugerindo a aquisição de um fenótipo mais desdiferenciado.

Os efeitos migratórios das citocinas nas CMLs são estudados principalmente nas células vasculares, pois estão associados a patologias, como arteriosclerose. Nosso trabalho é pioneiro

em mostrar o efeito de citocinas presentes no soro na migração das CMLs de próstata. Embora existam relatos na literatura apresentando diferenças na expressão e sua relação com doenças prostáticas, podemos observar, que em condições reducionistas, o $TGF\beta 1$ e o $TGF\beta 3$ não têm efeitos migratórios na CMLs. Futuros trabalhos devem ser realizados para saber se realmente essas células não são responsivas pela ausência ou redução dos receptores, bem como, se os efeitos migratórios do $TGF\alpha$ estão associados a mudanças nos marcadores do fenótipo contrátil e qual seria a possível sinalização envolvida.

4. Conclusões

- Diferentes concentrações do $TGF\alpha$ estimulam a migração das CMLs de próstata.
- O $TGF\beta 1$ e $TGF\beta 3$ não têm efeitos na migração das CMLs.

5. Referências Bibliográficas

- Ahmann, K.A., J.S. Weinbaum, S.L. Johnson, and R.T. Tranquillo. 2010. Fibrin degradation enhances vascular smooth muscle cell proliferation and matrix deposition in fibrin-based tissue constructs fabricated in vitro. *Tissue engineering. Part A*. 16:3261-3270.
- Ai, S., M. Kuzuya, T. Koike, T. Asai, S. Kanda, K. Maeda, T. Shibata, and A. Iguchi. 2001. Rho-Rho kinase is involved in smooth muscle cell migration through myosin light chain phosphorylation-dependent and independent pathways. *Atherosclerosis*. 155:321-327.
- Alam, S.G., Q. Zhang, N. Prasad, Y. Li, S. Chamala, R. Kuchibhotla, B. Kc, V. Aggarwal, S. Shrestha, A.L. Jones, S.E. Levy, K.J. Roux, J.A. Nickerson, and T.P. Lele. 2016. The mammalian LINC complex regulates genome transcriptional responses to substrate rigidity. *Scientific reports*. 6:38063.
- Allen, R., and Y. Wang. 2011. Rapid Self-Assembly of Tubular Arterial Media Layer from Smooth Muscle Cells in Transient Fibrin Gel. *Journal of tissue science & engineering*. 10.
- Antonioli, E., A.B. Cardoso, and H.F. Carvalho. 2007. Effects of long-term castration on the smooth muscle cell phenotype of the rat ventral prostate. *Journal of andrology*. 28:777-783.
- Antonioli, E., H.H. Della-Colleta, and H.F. Carvalho. 2004. Smooth muscle cell behavior in the ventral prostate of castrated rats. *Journal of andrology*. 25:50-56.
- Arold, S.T. 2011. How focal adhesion kinase achieves regulation by linking ligand binding, localization and action. *Current opinion in structural biology*. 21:808-813.
- Bandyopadhyay, B., J. Fan, S. Guan, Y. Li, M. Chen, D.T. Woodley, and W. Li. 2006. A "traffic control" role for TGFbeta3: orchestrating dermal and epidermal cell motility during wound healing. *The Journal of cell biology*. 172:1093-1105.
- Beamish, J.A., P. He, K. Kottke-Marchant, and R.E. Marchant. 2010. Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue engineering. Part B, Reviews*. 16:467-491.
- Bershadsky, A.D., N.Q. Balaban, and B. Geiger. 2003. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annual review of cell and developmental biology*. 19:677-695.
- Biancardi, M.F., F.C.A. Dos Santos, H.F. de Carvalho, B.D.A. Sanches, and S.R. Taboga. 2017. Female prostate: historical, developmental, and morphological perspectives. *Cell biology international*. 41:1174-1183.

- Brandes, D. 1966. The fine structure and histochemistry of prostatic glands in relation to sex hormones. *International review of cytology*. 20:207-276.
- Brandstrom, A., P. Westin, A. Bergh, S. Cajander, and J.E. Damber. 1994. Castration induces apoptosis in the ventral prostate but not in an androgen-sensitive prostatic adenocarcinoma in the rat. *Cancer research*. 54:3594-3601.
- Breyer, J., J. Samarin, M. Rehm, L. Lautscham, B. Fabry, and M. Goppelt-Struebe. 2012. Inhibition of Rho kinases increases directional motility of microvascular endothelial cells. *Biochemical pharmacology*. 83:616-626.
- Castillo-Pichardo, L., T. Humphries-Bickley, C. De La Parra, I. Forestier-Roman, M. Martinez-Ferrer, E. Hernandez, C. Vlaar, Y. Ferrer-Acosta, A.V. Washington, L.A. Cubano, J. Rodriguez-Orengo, and S. Dharmawardhane. 2014. The Rac Inhibitor EHop-016 Inhibits Mammary Tumor Growth and Metastasis in a Nude Mouse Model. *Translational oncology*. 7:546-555.
- Cohen, M., D. Joester, B. Geiger, and L. Addadi. 2004. Spatial and temporal sequence of events in cell adhesion: from molecular recognition to focal adhesion assembly. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. 5:1393-1399.
- Cunha, G.R., and L.W. Chung. 1981. Stromal-epithelial interactions--I. Induction of prostatic phenotype in urothelium of testicular feminized (Tfm/y) mice. *Journal of steroid biochemistry*. 14:1317-1324.
- Cunha, G.R., S.W. Hayward, R. Dahiya, and B.A. Foster. 1996. Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta anatomica*. 155:63-72.
- Cheng, L., J. Xu, Y.Y. Qian, H.Y. Pan, H. Yang, M.Y. Shao, R. Cheng, and T. Hu. 2017. Interaction between mDia1 and ROCK in Rho-induced migration and adhesion of human dental pulp cells. *International endodontic journal*. 50:15-23.
- Ching, K.Z., E. Ramsey, N. Pettigrew, R. D'Cunha, M. Jason, and J.G. Dodd. 1993. Expression of mRNA for epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and their receptor in human prostate tissue and cell lines. *Molecular and cellular biochemistry*. 126:151-158.
- Danielpour, D. 2005. Functions and regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) in the prostate. *European journal of cancer*. 41:846-857.
- de Carvalho, H.F., and S.R. Line. 1996. Basement membrane associated changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell biology international*. 20:809-819.

- Della-Colleta, H.H.M., and H.F. Carvalho. 2018. Hyaluronan content and distribution in the rat ventral prostate after castration. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 96:556-563.
- Derynck, R., and E.H. Budi. 2019. Specificity, versatility, and control of TGF-beta family signaling. *Science signaling*. 12.
- Djonov, V., A. Andres, H. Altermatt, and V. Merz. 1997. TGF-beta 3 expression correlates with epithelial cell death in normal, hyperplastic and malignant prostate. *International journal of oncology*. 11:1185-1190.
- Doevendans, P.A., and G. van Eys. 2002. Smooth muscle cells on the move: the battle for actin. *Cardiovascular research*. 54:499-502.
- Drury, J.L., and D.J. Mooney. 2003. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*. 24:4337-4351.
- Frantz, C., K.M. Stewart, and V.M. Weaver. 2010. The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science*. 123:4195-4200.
- Geiger, B., A. Bershadsky, R. Pankov, and K.M. Yamada. 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2:793-805.
- Gerdes, M.J., T.D. Dang, M. Larsen, and D.R. Rowley. 1998a. Transforming growth factor-beta1 induces nuclear to cytoplasmic distribution of androgen receptor and inhibits androgen response in prostate smooth muscle cells. *Endocrinology*. 139:3569-3577.
- Gerdes, M.J., T.D. Dang, B. Lu, M. Larsen, L. McBride, and D.R. Rowley. 1996. Androgen-regulated proliferation and gene transcription in a prostate smooth muscle cell line (PS-1). *Endocrinology*. 137:864-872.
- Gerdes, M.J., M. Larsen, T.D. Dang, S.J. Ressler, J.A. Tuxhorn, and D.R. Rowley. 2004. Regulation of rat prostate stromal cell myodifferentiation by androgen and TGF-beta1. *The Prostate*. 58:299-307.
- Gerdes, M.J., M. Larsen, L. McBride, T.D. Dang, B. Lu, and D.R. Rowley. 1998b. Localization of transforming growth factor-beta1 and type II receptor in developing normal human prostate and carcinoma tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 46:379-388.
- Goitre, L., E. Trapani, L. Trabalzini, and S.F. Retta. 2014. The Ras superfamily of small GTPases: the unlocked secrets. *Methods in molecular biology*. 1120:1-18.
- Guo, X., and S.Y. Chen. 2012. Transforming growth factor-beta and smooth muscle differentiation. *World journal of biological chemistry*. 3:41-52.

- Hall, A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 279:509-514.
- Hall, A. 2012. Rho family GTPases. *Biochemical Society transactions*. 40:1378-1382.
- Hautmann, M.B., C.S. Madsen, and G.K. Owens. 1997. A transforming growth factor beta (TGFbeta) control element drives TGFbeta-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin gene expression in concert with two CArG elements. *The Journal of biological chemistry*. 272:10948-10956.
- Hayek, O.R., A. Shabsigh, S.A. Kaplan, A.J. Kiss, M.W. Chen, T. Burchardt, M. Burchardt, C.A. Olsson, and R. Buttyan. 1999. Castration induces acute vasoconstriction of blood vessels in the rat prostate concomitant with a reduction of prostatic nitric oxide synthase activity. *The Journal of urology*. 162:1527-1531.
- Hayman, E.G., M.D. Pierschbacher, S. Suzuki, and E. Ruoslahti. 1985. Vitronectin--a major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum. *Experimental cell research*. 160:245-258.
- Heino, J. 2014. Cellular signaling by collagen-binding integrins. *Advances in experimental medicine and biology*. 819:143-155.
- Hong, J.H., C. Song, Y. Shin, H. Kim, S.P. Cho, W.J. Kim, and H. Ahn. 2004. Estrogen induction of smooth muscle differentiation of human prostatic stromal cells is mediated by transforming growth factor-beta. *The Journal of urology*. 171:1965-1969.
- Hu, Z., T. Ito, K. Yuri, C. Xie, H. Ozawa, and M. Kawata. 1998. In vivo time course of morphological changes and DNA degradation during the degeneration of castration-induced apoptotic prostate cells. *Cell and tissue research*. 294:153-160.
- Huttenlocher, A., and A.R. Horwitz. 2011. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 3:a005074.
- Ittmann, M. 2018. Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 8.
- Janmey, P.A., and C.A. McCulloch. 2007. Cell mechanics: integrating cell responses to mechanical stimuli. *Annual review of biomedical engineering*. 9:1-34.
- Jorissen, R.N., F. Walker, N. Pouliot, T.P. Garrett, C.W. Ward, and A.W. Burgess. 2003. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental cell research*. 284:31-53.
- Katoh, K., Y. Kano, M. Amano, K. Kaibuchi, and K. Fujiwara. 2001. Stress fiber organization regulated by MLCK and Rho-kinase in cultured human fibroblasts. *American journal of physiology. Cell physiology*. 280:C1669-1679.

- Kerr, J.F., and J. Searle. 1973. Deletion of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. *Virchows Archiv. B, Cell pathology*. 13:87-102.
- Kleinschmidt, E.G., and D.D. Schlaepfer. 2017. Focal adhesion kinase signaling in unexpected places. *Current opinion in cell biology*. 45:24-30.
- Kolyada, A.Y., K.N. Riley, and I.M. Herman. 2003. Rho GTPase signaling modulates cell shape and contractile phenotype in an isoactin-specific manner. *American journal of physiology. Cell physiology*. 285:C1116-1121.
- Kunit, T., C. Gratzke, A. Schreiber, F. Strittmatter, R. Waidelich, B. Rutz, W. Loidl, K.E. Andersson, C.G. Stief, and M. Hennenberg. 2014. Inhibition of smooth muscle force generation by focal adhesion kinase inhibitors in the hyperplastic human prostate. *American journal of physiology. Renal physiology*. 307:F823-832.
- Kyprianou, N., and J.T. Isaacs. 1988. Identification of a cellular receptor for transforming growth factor-beta in rat ventral prostate and its negative regulation by androgens. *Endocrinology*. 123:2124-2131.
- Kyprianou, N., and J.T. Isaacs. 1989. Expression of transforming growth factor-beta in the rat ventral prostate during castration-induced programmed cell death. *Molecular endocrinology*. 3:1515-1522.
- Leav, I., J.E. McNeal, J. Ziar, and J. Alroy. 1998. The localization of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in stromal and epithelial compartments of developing human prostate and hyperplastic, dysplastic, and carcinomatous lesions. *Human pathology*. 29:668-675.
- Lee, C., S.M. Sintich, E.P. Mathews, A.H. Shah, S.D. Kundu, K.T. Perry, J.S. Cho, K.Y. Ilio, M.V. Cronauer, L. Janulis, and J.A. Sensibar. 1999. Transforming growth factor-beta in benign and malignant prostate. *The Prostate*. 39:285-290.
- Leimgruber, C., A.A. Quintar, N. Peinetti, M.V. Scalerandi, J.P. Nicola, J.M. Miano, and C.A. Maldonado. 2017. Testosterone Rescues the De-Differentiation of Smooth Muscle Cells Through Serum Response Factor/Myocardin. *Journal of cellular physiology*. 232:2806-2817.
- Lekas, E., M. Johansson, A. Widmark, A. Bergh, and J.E. Damber. 1997. Decrement of blood flow precedes the involution of the ventral prostate in the rat after castration. *Urological research*. 25:309-314.
- Li, Y., J. Fan, M. Chen, W. Li, and D.T. Woodley. 2006. Transforming Growth Factor-Alpha: A Major Human Serum Factor that Promotes Human Keratinocyte Migration. *Journal of Investigative Dermatology*. 126:2096-2105.

- Li, Y., H. Meng, Y. Liu, and B.P. Lee. 2015. Fibrin gel as an injectable biodegradable scaffold and cell carrier for tissue engineering. *TheScientificWorldJournal*. 2015:685690.
- Lim, S.T., X.L. Chen, Y. Lim, D.A. Hanson, T.T. Vo, K. Howerton, N. Larocque, S.J. Fisher, D.D. Schlaepfer, and D. Ilic. 2008. Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Molecular cell*. 29:9-22.
- Liu, B., H. Itoh, O. Louie, K. Kubota, and K.C. Kent. 2002. The signaling protein Rho is necessary for vascular smooth muscle migration and survival but not for proliferation. *Surgery*. 132:317-325.
- Louis, S.F., and P. Zahradka. 2010. Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion. *Experimental and clinical cardiology*. 15:e75-85.
- Mackay, D.J., and A. Hall. 1998. Rho GTPases. *The Journal of biological chemistry*. 273:20685-20688.
- Maldonado, M.D.M., and S. Dharmawardhane. 2018. Targeting Rac and Cdc42 GTPases in Cancer. *Cancer research*. 78:3101-3111.
- Massague, J. 2000. How cells read TGF-beta signals. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 1:169-178.
- Massague, J. 2012. TGFbeta signalling in context. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 13:616-630.
- Massague, J., and Y.G. Chen. 2000. Controlling TGF-beta signaling. *Genes & development*. 14:627-644.
- Meekins, L.C., N. Rosado-Adames, R. Maddala, J.J. Zhao, P.V. Rao, and N.A. Afshari. 2016. Corneal Endothelial Cell Migration and Proliferation Enhanced by Rho Kinase (ROCK) Inhibitors in In Vitro and In Vivo Models. *Investigative ophthalmology & visual science*. 57:6731-6738.
- Mitra, S.K., D.A. Hanson, and D.D. Schlaepfer. 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 6:56-68.
- Moiseeva, E.P. 2001. Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovascular research*. 52:372-386.
- Mouw, J.K., G. Ou, and V.M. Weaver. 2014. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 15:771-785.
- Nagle, R.B. 2004. Role of the extracellular matrix in prostate carcinogenesis. *Journal of cellular biochemistry*. 91:36-40.
- Naito, M., H. Nomura, and A. Iguchi. 1996. Migration of cultured vascular smooth muscle cells into non-crosslinked fibrin gels. *Thrombosis research*. 84:129-136.

- Nemeth, J.A., J.A. Sensibar, R.R. White, D.J. Zelner, I.Y. Kim, and C. Lee. 1997. Prostatic ductal system in rats: tissue-specific expression and regional variation in stromal distribution of transforming growth factor-beta 1. *The Prostate*. 33:64-71.
- Odero-Marrah, V., O. Hawsawi, V. Henderson, and J. Sweeney. 2018. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Prostate Cancer. *Advances in experimental medicine and biology*. 1095:101-110.
- Owens, G.K. 1995. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiological reviews*. 75:487-517.
- Owens, G.K., M.S. Kumar, and B.R. Wamhoff. 2004. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiological reviews*. 84:767-801.
- Panteleev, M.A., N.M. Dashkevich, and F.I. Ataulakhanov. 2015. Hemostasis and thrombosis beyond biochemistry: roles of geometry, flow and diffusion. *Thrombosis research*.
- Parsons, J.T., A.R. Horwitz, and M.A. Schwartz. 2010. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 11:633-643.
- Peehl, D.M., and R.G. Sellers. 1997. Induction of smooth muscle cell phenotype in cultured human prostatic stromal cells. *Experimental cell research*. 232:208-215.
- Perry, K.T., C.T. Anthony, and M.S. Steiner. 1997. Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in normal and malignant human prostate. *The Prostate*. 33:133-140.
- Prins, G.S., and O. Putz. 2008. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation; research in biological diversity*. 76:641-659.
- Rensen, S.S., P.A. Doevendans, and G.J. van Eys. 2007. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands heart journal : monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation*. 15:100-108.
- Risbridger, G.P., and R.A. Taylor. 2006. Chapter 23 - Physiology of the Male Accessory Sex Structures: The Prostate Gland, Seminal Vesicles, and Bulbourethral Glands. In Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition). J.D. Neill, T.M. Plant, D.W. Pfaff, J.R.G. Challis, D.M.d. Kretser, J.S. Richards, and P.M. Wassarman, editors. Academic Press, St Louis. 1149-1172.
- Rojas, A.M., G. Fuentes, A. Rausell, and A. Valencia. 2012. The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *The Journal of cell biology*. 196:189-201.

- Rosa-Ribeiro, R., G.O. Barbosa, F. Kuhne, and H.F. Carvalho. 2014. Desquamation is a novel phenomenon for collective prostate epithelial cell deletion after castration. *Histochemistry and cell biology*. 141:213-220.
- Rovin, J.D., H.F. Frierson, Jr., W. Ledin, J.T. Parsons, and R.B. Adams. 2002. Expression of focal adhesion kinase in normal and pathologic human prostate tissues. *The Prostate*. 53:124-132.
- Rozario, T., and D.W. DeSimone. 2010. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Developmental biology*. 341:126-140.
- Santos, A.M., D. Schechtman, A.C. Cardoso, C.F. Clemente, J.C. Silva, M. Fioramonte, M.B. Pereira, T.M. Marin, P.S. Oliveira, A.C. Figueira, S.H. Oliveira, I.L. Torriani, F.C. Gozzo, J. Xavier Neto, and K.G. Franchini. 2012. FERM domain interaction with myosin negatively regulates FAK in cardiomyocyte hypertrophy. *Nature chemical biology*. 8:102-110.
- Schaller, M.D. 2010. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *Journal of cell science*. 123:1007-1013.
- Schor, S.L. 1980. Cell proliferation and migration on collagen substrata in vitro. *Journal of cell science*. 41:159-175.
- Schwartz, M. 2004. Rho signalling at a glance. *Journal of cell science*. 117:5457-5458.
- Selman, S.H. 2011. The McNeal prostate: a review. *Urology*. 78:1224-1228.
- Senapati, S., S. Rachagani, K. Chaudhary, S.L. Johansson, R.K. Singh, and S.K. Batra. 2010. Overexpression of macrophage inhibitory cytokine-1 induces metastasis of human prostate cancer cells through the FAK-RhoA signaling pathway. *Oncogene*. 29:1293-1302.
- Serrels, B., A. Serrels, V.G. Brunton, M. Holt, G.W. McLean, C.H. Gray, G.E. Jones, and M.C. Frame. 2007. Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex. *Nature cell biology*. 9:1046-1056.
- Shabisgh, A., N. Tanji, V. D'Agati, M. Burchardt, M. Rubin, E.T. Goluboff, D. Heitjan, A. Kiss, and R. Buttyan. 1999. Early effects of castration on the vascular system of the rat ventral prostate gland. *Endocrinology*. 140:1920-1926.
- Shi, Y., and J. Massague. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 113:685-700.
- Somaiah, C., A. Kumar, D. Mawrie, A. Sharma, S.D. Patil, J. Bhattacharyya, R. Swaminathan, and B.G. Jaganathan. 2015. Collagen Promotes Higher Adhesion, Survival and Proliferation of Mesenchymal Stem Cells. *PLoS one*. 10:e0145068.

- Stamatiou, R., E. Paraskeva, K. Gourgoulisanis, P.A. Molyvdas, and A. Hatziefthimiou. 2012. Cytokines and growth factors promote airway smooth muscle cell proliferation. *ISRN inflammation*. 2012:731472.
- Stylianou, A., V. Gkretsi, M. Louca, L.C. Zacharia, and T. Stylianopoulos. 2019. Collagen content and extracellular matrix cause cytoskeletal remodelling in pancreatic fibroblasts. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*. 16:20190226.
- Tai, Y.L., L.C. Chen, and T.L. Shen. 2015. Emerging Roles of Focal Adhesion Kinase in Cancer. *BioMed research international*. 2015:690690.
- Totsukawa, G., Y. Wu, Y. Sasaki, D.J. Hartshorne, Y. Yamakita, S. Yamashiro, and F. Matsumura. 2004. Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *The Journal of cell biology*. 164:427-439.
- Tuxhorn, J.A., G.E. Ayala, and D.R. Rowley. 2001. Reactive stroma in prostate cancer progression. *The Journal of urology*. 166:2472-2483.
- Vilamaior, P.S., S.L. Felisbino, S.R. Taboga, and H.F. Carvalho. 2000. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. *The Prostate*. 45:253-258.
- Vilamaior, P.S., S.R. Taboga, and H.F. Carvalho. 2005. Modulation of smooth muscle cell function: morphological evidence for a contractile to synthetic transition in the rat ventral prostate after castration. *Cell biology international*. 29:809-816.
- Wilding, G., E. Valverius, C. Knabbe, and E.P. Gelmann. 1989. Role of transforming growth factor-alpha in human prostate cancer cell growth. *The Prostate*. 15:1-12.
- Worth, N.F., G.R. Campbell, J.H. Campbell, and B.E. Rolfe. 2004. Rho expression and activation in vascular smooth muscle cells. *Cell motility and the cytoskeleton*. 59:189-200.
- Zaviacic, M., and R.J. Ablin. 2000. The female prostate and prostate-specific antigen. Immunohistochemical localization, implications of this prostate marker in women and reasons for using the term "prostate" in the human female. *Histology and histopathology*. 15:131-142.

6. Anexos

6.1 Termo de aprovação da pesquisa pela Comissão de Bioética



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Células musculares lisas prostáticas (*Rattus norvegicus* - Wistar): regulação da diferenciação e da ativação da quinase de adesão focal (FAK) pela interação com o epitélio e com a matriz extracelular", protocolo nº 4132-1, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho / Daniel Andrés Osorio Rodríguez, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA**, tendo sido aprovado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em 1º. de abril de 2016.

Vigência do projeto: 08/2015-08/2019

Início do experimento envolvendo manipulação animal: ABRIL/2016

Espécie/Linhagem: Rato heterogênico / Wistar

No. de animais: 36

Idade/Peso: 21 dias / 45g

Sexo: machos

Origem: CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 1º. de abril de 2016.

Prof. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

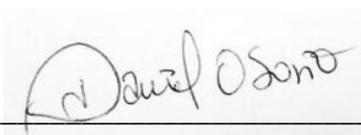
6.2 Declaração referente a direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Tese de Doutorado, intitulada EFEITO DA MATRIZ EXTRACELULAR NAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS PROSTÁTICAS IN VITRO, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 20 de novembro de 2019

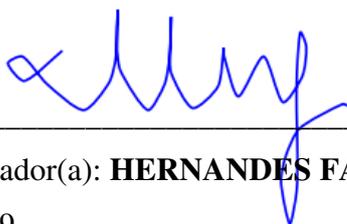
Assinatura : _____



Nome do(a) autor(a): **DANIEL ANDRES OSORIO RODRIGUEZ**

RNE n.º V894753H

Assinatura : _____



Nome do(a) orientador(a): **HERNANDES FAUSTINO DE CARVALHO**

RG n.º 32190095-9