

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

PAPEL DAS INTEGRINAS $\alpha_v\beta_3$ E $\alpha_5\beta_1$ NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DE TUMOR DE MAMA TRIPLO NEGATIVO E CÉLULAS ENDOTELIAIS EM HIPOXIA.

Bruna Carla Casali

Orientadora: Heloísa Sobreiro Selistre de Araujo

São Carlos
2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

PAPEL DAS INTEGRINAS $\alpha v\beta 3$ E $\alpha 5\beta 1$ NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DE TUMOR DE MAMA TRIPLO NEGATIVO E CÉLULAS ENDOTELIAIS EM HIPOXIA.

Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência.

São Carlos
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós - Graduação em Genética Evolutiva e Biologia

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Bruna Carla Casali, realizada em 14/04/2022.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo (UFSCar)

Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti (UFSCar)

Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues (UFSCar)

Profa. Dra. Mariana Tomazini Pinto (HCB)

Profa. Dra. Wanessa Fernanda Altei (HCB)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Dedico este trabalho à minha mãe, Marlene Salvini Casali, pelo respeito ao meu estudo, apoio, conselhos e amor. Também dedico este trabalho em memória ao meu pai, João Carlos Casali, pelo incentivo, educação, promessa feita e cumprida na fase terminal da sua doença para realizar o meu sonho de ingressar na pós-graduação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha orientadora, Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, que me ensinou a fazer pesquisa, acreditou em mim enquanto alguns duvidavam, e sempre me incentivou ser uma pessoa melhor na área acadêmica e pessoal. Obrigada, Helo!

Sou grata aos ensinamentos espiritualistas de diferentes religiões, em especial a Doutrina Espírita, a qual me sinto mais próxima e grata durante a minha vida.

Gratidão aos meus pais que me educaram de uma forma acolhedora e amorosa. A saudade da presença física do meu pai é enorme, porém ainda escuto seus conselhos e broncas ao silenciar minha mente e acalmar meu coração. Obrigada minha querida mãe por todos os momentos que esteve ao meu lado, nos momentos de café e pão quentinho (rs). Eu sei que posso contar sempre com o seu colo para chorar, além de me dar mil motivos para sorrir. Eu sou parte de vocês.

Ao LBBM, somos um grupo forte com pessoas e histórias diferentes, porém o mesmo caminho nos une, a pesquisa. Aníssi, uma amiga dentro e fora do lab, você foi especial em vários momentos, desde desabafos até gargalhadas; espero que nossa amizade continue sempre. Bianca, a pessoa que menos espera é a que te ajuda na hora do aperto, obrigada. Grazi, tivemos altos e baixos, porém sempre me espelho em pessoas fortes e guerreiras, e você é uma delas. Bianquinha, uma garota sensível que passou por muitas coisas durante a pós, parabéns pela finalização do seu mestrado. Wanessa, me ensinou muito também durante toda a trajetória do LBBM, uma pesquisadora e tanto. Obrigada pela paciência e ajuda. Kelli, uma grande amiga e profissional. Mônica, uma grande parceira de trabalho que me ensinou a respirar em alguns momentos. Obrigada à Bete e aos ICs, Aline, Lari, João e Matheus, pela ajuda e bom funcionamento do lab, em especial ao Matheus que foi essencial na finalização do meu doutorado e implementação da cultura 3D no laboratório.

Não posso esquecer de algumas pessoas que não são mais do LBBM, mas fizeram diferença na minha vida, Patty, Milene e Uliana, obrigada pelo carinho. Talita que não é do LBBM, mas sim uma colaboradora que tive prazer de conhecer.

Obrigada as colaborações, pesquisadores e técnicos que me acompanharam em diferentes experimentos e análises. Ao Hospital de Amor – Wanessa Altei; Instituto Butantan – Giselle Pidle; UNIFESP – Ricardo Toquarto e BCRJ – Leandra Baptista. Aos colaboradores da UFSCar, Driele Tavares (LZBC), Paulo Andrade (Lab. De Patologia e Biocompatibilidade) e Prof. Dr. Ricardo Borra que me ajudaram com a cultura 3D. Também agradeço ao Prof. Dr. Hugo pelo incentivo

profissional. Aos docentes e discentes do PPGGEV e do DCF que contribuíram para a minha vida acadêmica.

À CAPES pela bolsa de doutorado, ao PPGGEV por me indicar para bolsa do doutorado, e o PROGRAMA DE APOIO E PROJETO A PESQUISA – PAPq, CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro.

COLABORAÇÕES

UNIFESP - Departamento de Bioquímica, São Paulo e Butantan e Laboratório de Imunoquímica, São Paulo. *Surface Plasmon Resonance (SPR)*, acompanhado por Ricardo Toquarto. Responsável: Dra. **Adriana K. Carmona e Aparecida S. Tanaka.**

Butantan – Laboratório de Imunoquímica, São Paulo. *Surface Plasmon Resonance (SPR)*, acompanhada com a Giselle Pidelle. Responsável: Dra. Ana Marisa Chudzinski Tavassi

Hospital de Amor – Microscópio Confocal, Barretos. Acompanhada por Dra. Wanessa F. Altei

UFSCar, Laboratório de Patologia e Biocompatibilidade, Histologia acompanhada pelo técnico: Paulo. Responsável: Dr. Fábio Gonçalves Pinto e Dra. Karina Nogueira Zambone Pinto Rossi

UFSCar, Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC), Histologia acompanhada pela Driele Tavares. Responsável: Dra. Marisa Narciso Fernandes.

*“Eu levanto minha voz, não para gritar,
mas para aqueles sem voz, possam ser
ouvidos!”*

Malala Yousafzai

RESUMO

O câncer de mama em mulheres possui alta incidência e mortalidade nos casos oncológicos em 2020. O microambiente tumoral é composto por diversos elementos, como a matriz extracelular (MEC). As proteínas da MEC se ligam às células através de receptores, como as integrinas que controlam processos celulares. O padrão de expressão de integrinas pode estar muito alterado em células tumorais comparado ao de células não tumorais. Desta forma, as integrinas vem sendo estudadas como possíveis alvos para o tratamento do câncer e para prevenção de metástases. No entanto, a grande maioria dos efeitos de inibidores de integrinas descritos na literatura foram feitos em normóxia, condição diferente do que ocorre no microambiente tumoral de tumores sólidos. DisBa-01, desintegrina recombinante de *Bothrops alternatus*, bloqueador da integrina $\alpha_v\beta_3$, induz à perda da direcionalidade da célula tumoral bucal (OSSC), é antiangiogênica, e inibe a expressão de VEGF e de VEGF-R em células endoteliais. Todos os estudos *in vitro* anteriores foram feitos em condições de normóxia e em cultivo em monocamada. Neste projeto, estudamos o efeito do bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ pela DisBa-01 em célula tumoral de mama (MDA-MB-231) e célula endotelial (HUVEC) em cultura 2D e 3D sob hipóxia, além das interações de alvos secundários. Foram utilizados modelos migratórios como, *Boyden chamber*, transmigração endotelial, ensaio de *wound healing* na presença da DisBa-01. Analisamos as possíveis interações entre a DisBa-01 e a proteína de matriz e VEGFR2 por ressonância plasmônica de superfície. A DisBa-01 tem efeitos similares em normóxia e hipóxia para os experimentos da migração *transwell* e transmigração endotelial da célula MDA-MB-231. Para o ensaio de *wound healing* maiores concentrações da DisBa-01 foram necessárias para a inibição da migração e foi observado a diminuição da atividade da Pro-MMP-9 do meio condicionado desse ensaio. DisBa-01 (1000 nM) inibiu a formação de tubo da HUVEC, migração *transwell* e ensaio de *wound healing* sob hipóxia. Para a cultura 3D, a inibição da migração a partir de compacto agregado formado por células MDA-MB-231 e para o esferóide da HUVEC foram semelhantes em ambas condições de oxigenação e tratamento com a DisBa-01. Além disso, DisBa-01 se liga na fibronectina (FN), vitronectina (VN) e VEGFR2 com menor afinidade comparado a integrina $\alpha_v\beta_3$. A interação do complexo DisBa-01-integrina $\alpha_v\beta_3$ colocaliza-se com a VN e FN na HUVEC. Esses resultados indicam que a função da integrina $\alpha_v\beta_3$ na motilidade celular depende do ensaio e nível de oxigênio, e altas concentrações do inibidor podem ser necessárias para atingir o mesmo efeito inibitório comparado com normóxia.

Palavras-chave: câncer, metástase, integrina $\alpha_v\beta_3$, desintegrina, hipóxia, microambiente tumoral

ABSTRACT

Breast tumors show high incidence and mortality for female oncologic cases in 2020. Tumor microenvironment presents several elements, such as extracellular matrix (ECM). ECM proteins bind to cells through receptors such as the integrins that control cellular processes. Patterns of integrin expression are changed in tumor cells compared with non-tumor cells. Thus, integrins are studied as possible targets for cancer treatment and metastases prevention. However, most inhibitor effects described in literature are in normoxia, a different condition that is found in the tumor microenvironment. DisBa-01, recombinant protein from *Bothrops alternatus*, is an $\alpha_v\beta_3$ integrin blocker, induces loss of OSSC (Oral Squamous Cell Carcinoma) directionally in fibronectin coating, is anti-angiogenic, and inhibits VEGF and VEGFR2 expression in endothelial cell. Until now, these studies were done *in-vitro* in normoxia and 2D culture, beyond that interactions with secondaries targets. This project studied the effect of blocking $\alpha_v\beta_3$ integrin treated with DisBa-01 in breast tumor cells (MDA-MB-231) and endothelial cells (HUVEC) in 2D and 3D cultures under hypoxia. We analyzed possible interactions between DisBa-01, ECM proteins and VEGF-R2. We used migratory models including Boyden chamber, endothelial transmigration, wound healing assay treated with DisBa-01. DisBa-01 induced similar effects in normoxia and hypoxia in transwell migration and endothelial transmigration for MDA-MB-231 cells. For wound healing assays, higher concentrations of DisBa-01 were necessary for migration inhibition. DisBa-01 (1000 nM) inhibits tube formation, transwell migration and wound healing assay under hypoxia. For 3D culture, migration inhibition from compact aggregates produced by MDA-MB-231 cell and spheroid produced by HUVEC are similar in both oxygenations treated with DisBa-01. DisBa-01 binds to fibronectin (FN), vitronectin (VN) and VEGFR2 with lower affinity compared with $\alpha_v\beta_3$ integrin. DisBa-01- $\alpha_v\beta_3$ integrin-complex interaction colocalizes with FN and VN in HUVEC. These results show that $\alpha_v\beta_3$ integrin function in cellular motility depends on the assay and oxygenation condition, and higher concentration of inhibitor to cause the same effect in normoxia.

Keys words: cancer, metastasis, $\alpha_v\beta_3$ integrin, disintegrin, hypoxia, tumor microenvironment

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Comparação dos subtipos entre as linhagens celulares de câncer de mama. Adaptado de DAI et al., 2017. 17
- Figura 2: Estroma tumoral e a matriz extracelular em hipóxia. Modificado de PETROVA et al. 2018 18
- Figura 3: O aumento do tumor leva à vascularização desorganizada em regiões de baixa oxigenação, aumentando a agressividade tumoral, resistência a diferentes modalidades terapêuticas e mau prognóstico para os pacientes. Imagem modificada de RAMACHANDRAN, et al 2015. 19
- Figura 4: Influência da hipóxia tumoral na angiogênese e migração celular. A) Aumento do VEGF e da angiogênese na hipóxia tumoral. B) Invasão tumoral através dos vasos sanguíneos. C) Extravasamento da célula tumoral para o nicho secundário. Adaptado de RAHIMI, 2012 e REYMOND, BORDA D'ÁGUA, RIDLEY, 2013 20
- Figura 5: Dinâmica entre EMT e MET: a plasticidade epitelial-mesenquimal. Adaptado de BATHIA et al., 2020. 21
- Figura 6: Esquema das estruturas das MMPs. Adaptado de BAUVOIS, 2012; HSIO et al., 2019; RADISKY, RAEESZADEH-SARMAZDEH, RADISKY, 2017. 22
- Figura 7: Esquema dos possíveis estados conformacionais das integrinas. Adaptado de TOLOMELLI et al., 2017..... 23
- Figura 8: Interação entre o colágeno e a célula formada pela ligação direta ou indireta. A ligação direta é mediada pela integrina e o colágeno, e ligação indireta é mediada por uma ponte (FN) entre a integrina e colágeno denominado COLINBRI (*COLlagen INtegrin BRIdging*) por ZELTZ, ORGEL, GULLBERG, 2014. 24
- Figura 9: Organização espacial da cultura 3D comparada com o microambiente tumoral *in-vivo*, mostrando a difusão dos nutrientes, oxigenação e local que o fármaco pode ser encontrado. (STADLER et al., 2015)..... 26
- Figura 10: Microscopia Eletrônica da mudança conformacional da integrina. Adaptado de LI et al., 2019 28
- Figura 11: Comportamento das integrinas na ligação de agonistas e antagonista (TOLOMELLI et al., 2017)..... 28
- Figura 12: Aglomerado disperso x aglomerado compacto da célula MDA-MB-231 e esferoide da HUVEC. A-B) Padronização da cultura 3D. C-D) Padronização da histologia do compacto agregado e esferoide em lâmina silanizada. 97
- Figura 13: Análise dos compactos agregados e esferóides A) Esquema mostrando os compactos

agregados e os esferóides transferidos na câmara de Boyden, com as células migrantes representadas como esferas azuis, seguida da fixação dos núcleos na membranda do inserto e imunomarcção. B-C) Inibição da migração das células MDA-MB-231 proveniente dos compactos agregados pelo tratamento com a DisBa-01 em normóxia e hipóxia. D-E) Inibição da migração de HUVECs proveniente dos esferóides pelo tratamento com a DisBa-01 em normóxia e hipóxia. Os resultados da inibição da migração (média \pm DP) foram comparados usando ANOVA two-way com pós teste de Tukey ($p < 0,05$ em três inventos dependentes ($n = 3$) em duplicata. A letra “a” dos gráficos representam as comparações das células não tratadas com as células tratadas com a DisBa-01 e também as células não tratadas em normóxia e hipóxia. 98

Figura 14: Análise da imunomarcção da cultura 3D de células MDA-MB-231. Foram utilizados como controle 1 (A): anticorpos secundários; para o controle 2, (B): controle sem anticorpos; (C): imunomarcção com anticorpos primários e secundários; D: imagem normalizada para quantificação..... 100

Figura 15: Fluorescências da integrina $\alpha_v\beta_3$ e do colágeno tipo I do compacto agregado e esferóide. A) Imagens da fluorescência da integrina $\alpha_v\beta_3$, do colágeno tipo I e merge do compacto agregado. B) Quantificação da fluorescência da integrina $\alpha_v\beta_3$, C) e do colágeno tipo I dos compactos agregados. D) Imagens da fluorescência da integrina $\alpha_v\beta_3$, do colágeno tipo I e merge do esferóide. E) Quantificação da fluorescência da integrina $\alpha_v\beta_3$, F) e do colágeno tipo I dos esferóides. Os grupos foram comparados usando ANOVA two-way com pós teste de Tukey ($p < 0,05$) ou Análise de variância de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn. A letra “a” dos gráficos representam as comparações das células não tratadas com as células tratadas com a DisBa-01 e também as células não tratadas em normóxia e hipóxia. 101

Figura 16: Curva em U x Curva em sino plotado a partir da figura 13-B da inibição da migração das células MDA-MB-231 provenientes dos compactos agregados 103

Figura 17: Curvas Sigmoidais clássicas plotadas a partir da figura 13-D da inibição da migração de HUVECs provenientes dos esferóides..... 106

Figura 18: A sutil interação entre DisBa-01 e o VEGF-R2. A) Gráfico da ligação da DisBa-01 com o VEGF-R2, Resposta Relativa (RU) x ciclo (concentração do analito), e tabela referente ao gráfico. B) Constante de dissociação (kd) entre a DisBa-01 e o VEGF-R2. Cálculo analisado pelo GraphPad e feito no GraFit 7.0. C) Sensograma em RU (Unidade de Ressonância) x tempo (em segundos). D) Sensograma normalizado (baseline acima de 0), $n=3$ 110

Figura 19: Análise do marcador EndoMT com o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ através do tratamento da DisBa-01 na HUVEC em normóxia e hipóxia. A) Imagens da VE-caderina (em verde) em torno dos núcleos da HUVEC (em azul) em normóxia e hipóxia, com e sem o tratamento da DisBa-01. B) Quantificação da VE-caderina na HUVEC. C) Controle negativo. As imagens foram subtraídas pelo controle negativo seguida da quantificação da imunofluorescência. A intensidade da VE-Caderina foi comparada usando ANOVA two-way com pós teste de Tukey ($p < 0,05$). A letra “a” dos gráficos representam as comparações das células não tratadas com as células tratadas com a DisBa-01 e também as células não tratadas em normóxia e hipóxia..... 111

Figura 20: Diferentes interações em $k_d=[M]$ entre analito x ligante..... 113

Figura 21: Esquema da análise das considerações finais. Inferimos que o bloqueio da integrina $\alpha\beta_3$ pode dificultar o desenvolvimento e migração no microambiente tumoral em normóxia e em hipóxia. 116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer com alta incidência estimados para 2020, exceto pele não melanoma. (INCA)	16
Tabela 2: Classificação do subtipo de câncer de mama (HE, et al. 2019).....	17
Tabela 3: Comparações entre as características EMT e EndoMT. Adaptado de PLATEL et al., 2019; LIMA et al., 2016; MEDICI, KALLURI, 2012.	21
Tabela 4: Meio base da cultura 3D.....	36
Tabela 5: Análise da inibição da migração das células MDA-MB-231 em cultura 3D e monocamada em possível “curvas em U” em 100 nM da DisBa-01. A) Modelos migratórios da célula MDA-MB-231 e B) quantificações da integrina $\alpha_v\beta_3$ e subunidade da integrina β_3 . Abreviações: norm= normóxia, hip= hipóxia.	104
Tabela 6: Análise da inibição da migração das células de HUVECs em cultura 3D e monocama em possíveis “curvas em U” em 100 nM da DisBa-01. A) Modelos migratórios da HUVEC e B) quantificações da integrina $\alpha_v\beta_3$ e subunidade da integrina β_3 . Abreviações: norm= normóxia, hip= hipóxia.	106

LISTA DE ABREVIATURAS

CAF: fibroblasto associado ao câncer

DisBa-01: Desintegrina recombinante de *Bothrops alternatus*

EMT: Transição epitélio para mesenquimal

EndoMT: Transição endotelial para mesenquimal

ER: receptor de estrogênio

FAK: quinase de adesão focal

FN: fibronectina

HER2: fator de crescimento epidérmico humano-2

HIF1 e HIF2: fatores induzidos por hipóxia 1 e 2

HRE: elementos de resposta à hipóxia

MEC: matriz extracelular

MET: Transição mesenquimal para epitelial

MMP-2 e MMP-9: metaloproteases de matriz 2 e 9

PR: receptor de progesterona

pVHL: proteína de von-Hippel-Lindau, proteína supressora de tumor

RU: Unidade de Ressonância

TGF- β : fator de crescimento transformante beta

TNBC: câncer de mama triplo negativo

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR2: Receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular

VN: vitronectina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 O CÂNCER DE MAMA E O MICROAMBIENTE TUMORAL HIPÓXICO	16
1.2 ANGIOGÊNESE TUMORAL	19
1.3 TRANSIÇÃO EPITÉLIO OU ENDOTELIAL PARA MESENQUIMAL, EMT e EndoMT	20
1.4 METALOPREINASES OU METALOPROTEASES DE MATRIZ, MMPs	22
1.5 AS INTEGRINAS E SUAS INTERAÇÕES	23
1.6 AS INTEGRINAS EM AMBIENTE HIPÓXICO	24
1.7 A CULTURA TRIDIMENSIONAL E AS INTEGRINAS EM CULTURA 3D	25
1.7 INIBIDOR DA INTEGRINA $\alpha_v\beta_3$	27
1.8 DESINTEGRINAS	28
2. JUSTIFICATIVA	29
3. HIPÓTESE	30
4.1 OBJETIVO PRINCIPAL	30
4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	30
5. MÉTODOS	30
5.1 Expressão e Purificação da DisBa-01	30
5.2 Cultivo celular em condições de normóxia e de hipóxia	31
5.3 Migração Celular da MDA-MB-231 e HUVEC por <i>Wound Healing</i>	32
5.4 Apoptose por citometria	32
5.5 Migração Celular da MDA-MB-231 em câmara de <i>Boyden</i> – Migração <i>transwell</i>	32
5.6 Transmigração da MDA-MB-231 através de uma camada de célula endotelial (HUVEC) em câmara de <i>Boyden</i>	33
5.7 Determinação do perfil protéico de integrinas por citometria de fluxo	33
5.8 Zimografia	34
5.9 Ensaio de morfologia	34
5.10 Tubulogênese	35
5.11 Cultura 3D	35
5.11.1 Padronização da cultura 3D	35
5.11.2 Remoção da cultura 3D do molde de agarose.	36
5.11.3 Migração Celular da cultura 3D da célula MDA-MB-231 e HUVEC em câmara de <i>Boyden</i>	

– Migração <i>transwell</i>	37
5.11.4 Imunofluorescência	37
5.12 Análise de Interação	38
5.12.1 Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR – <i>Surface Plasmon Resonance</i>)	38
5.12.2 Co-localização da DisBa-01 e do complexo DisBa-01- com a integrina $\alpha_v\beta_3$ com os componentes de matriz, FN e VN em HUVEC.....	39
5.13 Análise da EndoMT na HUVEC	39
5.14 Estatística.....	40
6. RESULTADOS.....	40
CAPÍTULO I: O efeito do bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ em células de tumor de mama em célula endotelial em ambiente hipóxico.....	42
CAPÍTULO II - Manuscrito em redação: DisBa-01 anchors endothelial cells to fibronectin and vitronectin through $\alpha_v\beta_3$ integrin.....	67
CAPÍTULO III: Consequências do bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ no compacto agregado da célula MDA-MB-231 e no esferóide da HUVEC com o tratamento da DisBa-01 em normóxia e hipóxia	96
III-A) RESULTADOS.....	96
III-B) DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	102
CAPÍTULO IV: A sutil interação entre a DisBa-01 com o VEGF-R2 e análise da EndoMT em HUVECs com o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$	109
IV-A) RESULTADOS	109
IV-B) DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	111
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	115
6. REFERÊNCIAS.....	117
7. PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	125

1. INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER DE MAMA E O MICROAMBIENTE TUMORAL HIPÓXICO

O câncer de mama feminino possuiu alta incidência global, sendo a principal causa de mortes, superando o tumor de pulmão, em casos oncológicos femininos, em 2020 (SUNG et al., 2021). Além disso, nesse mesmo ano, foram estimados 66.280 casos de câncer de mama no Brasil, sendo destes, aproximadamente 1% em homens (INCA – Instituto Nacional do Câncer, 2020). Para cada ano do triênio 2020-2022, são estimados cerca de 66 mil novos casos de câncer de mama no país (INCA, 2020) (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer com alta incidência estimados para 2020, exceto pele não melanoma. (INCA)

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	18.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.600	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

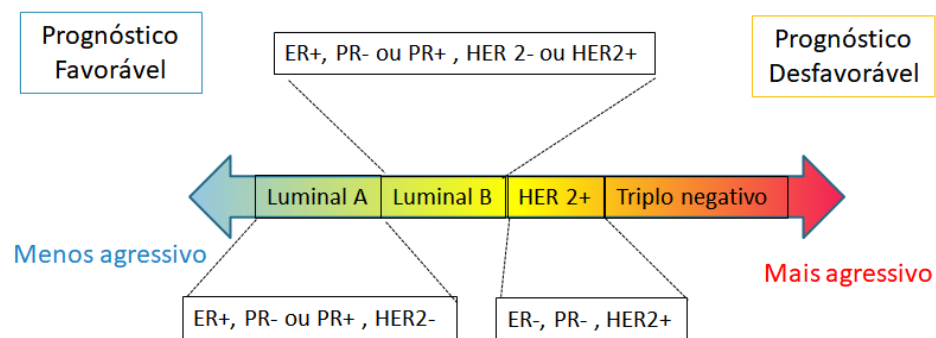
*Números arredondados para múltiplos de 10.

Os subtipos de câncer de mama são catalogados de acordo com os perfis de expressão de genes. O fenótipo triplo negativo (TNBC- *triple negative breast cancer*), é ausente para os receptores de estrogênio (ER - *estrogen receptor*), progesterona (PR - *progesterone receptor*) e fator de crescimento epidérmico humano-2 (HER2 - *human epithelial growth factor receptor 2*). Os outros subtipos de câncer de mama são classificados como luminal A, luminal B e HER2 positivo (HE et al., 2019) (Tabela 2). Para o luminal A é necessário apresentar ER positivo e HER negativo, sendo um tumor menos agressivo. Para o luminal B, apresenta-se ER positivo com característica de um tumor mais agressivo que o luminal A seguido do HER positivo. Vale ressaltar que a TNBC, entre 2-3 anos após o desenvolvimento tumoral, tem o maior risco para metástase comparado aos outros subtipos de doença e ainda com o prognóstico desfavorável (Fig.1) (DAI et al., 2017).

Tabela 2: Classificação dos subtipos de câncer de mama (HE, et al. 2019).

Subtypes	ER	PR	HER2
Luminal A	+	+/-	-
Luminal B	+	+/-	+/-
HER2+	-	-	+
TNBC	-	-	-

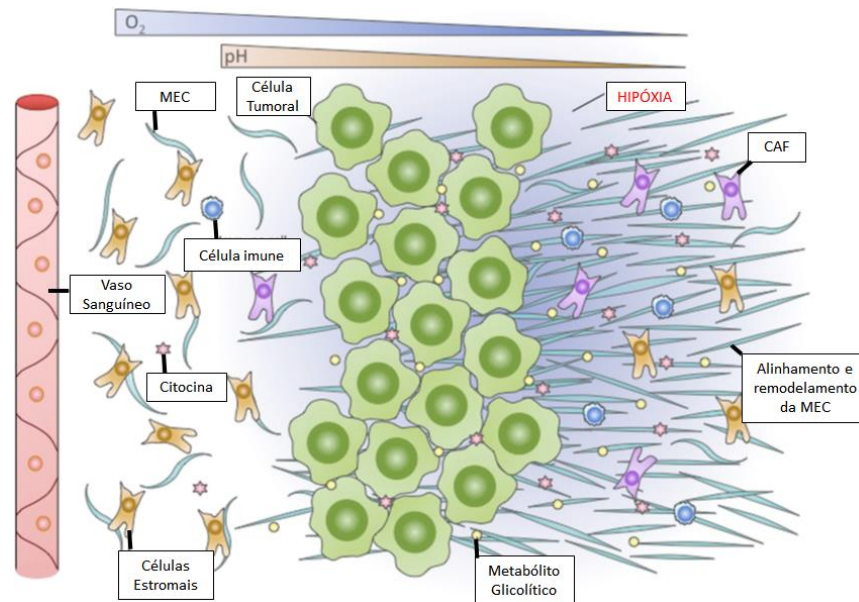
Figura 1: Comparação dos subtipos entre as linhagens celulares de câncer de mama. Adaptado de DAI et al., 2017.



O microambiente tumoral é composto por diversos elementos, celulares e não celulares, como a matriz extracelular (MEC), fatores de crescimento, citocinas, fibroblastos, células estromais e imunológicas, além de células endoteliais que revestem o vaso sanguíneo, levando assim os suprimentos para o tumor (NYBERG, SALO, KALLURI, 2008).

A MEC é composta por aproximadamente 300 componentes que regulam a homeostasia tecidual. Seus principais constituintes incluem proteínas fibrosas como colágenos (COL), laminina, vitronectina (VN) e fibronectina (FN), bem como glicosaminoglicanos e proteoglicanos tais como condroitina sulfato, heparan sulfato e sindecan, entre outros. Todos estes componentes organizam-se em uma rede de suporte aos diferentes tecidos que está em constante remodelamento para atender às diferentes necessidades teciduais ou para responder às alterações ambientais tais como as encontradas em um tumor. O aumento na expressão de genes relacionados ao remodelamento da MEC tem sido associado ao aumento da mortalidade em pacientes com câncer de mama, pulmão e de estômago (CHANG et al., 2004). Em especial, a deposição aumentada de colágeno (fibrose) foi descrita como um dos fatores causais da metástase e está localizada principalmente em regiões em hipóxia (GILKES, SEMENZA, WIRTZ, 2014; PETROVA et al. 2018) (Fig.2).

Figura 2: Estroma tumoral e a matriz extracelular em hipóxia. Modificado de PETROVA et al. 2018



O dramático efeito da hipóxia nas modificações pós-traducionais do colágeno é bem conhecido, no entanto pouco se sabe sobre a regulação da expressão gênica do colágeno em células tumorais em hipóxia tanto *in vitro* como *in vivo*. A fibrose é responsável pelo aumento da rigidez do tumor e o tumor de mama pode ser aproximadamente dez vezes mais rígido do que o estroma mamário não tumoral (PASZEK et al., 2005). A rigidez tumoral aumenta a tensão mecânica necessária para promover adesões focais, facilitando o *clustering* de integrinas que são receptores de membrana, ativando a quinase de adesão focal (FAK) que por sua vez irá disparar vias de sinalização que resultam em aumento de migração e invasão celulares (PROVENZANO, KEELY, 2009)

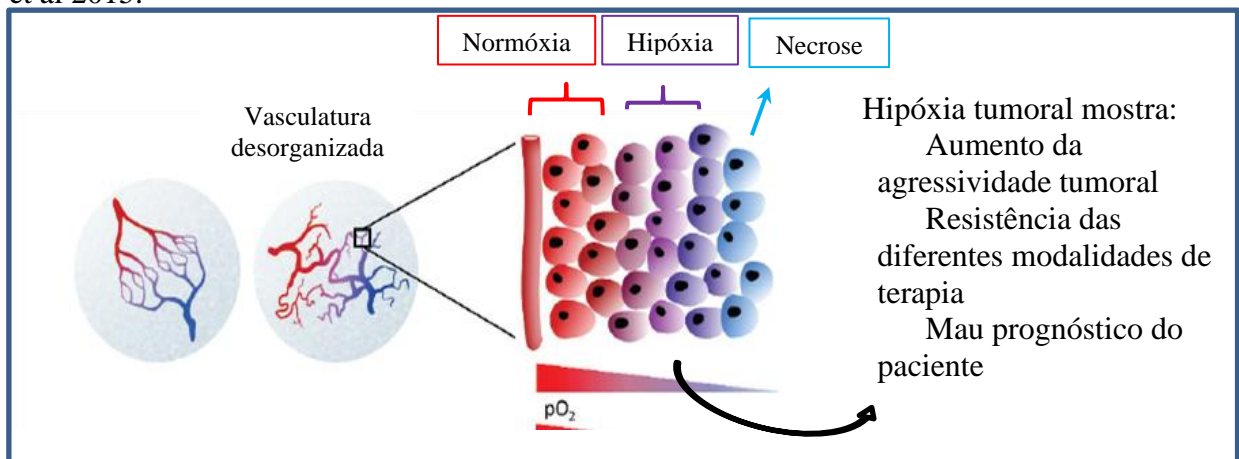
Em 1924 Warburg descreveu o aumento da glicólise em tumores, resultando assim em aumento dos níveis de ácido láctico e consequentemente na acidificação do ambiente tumoral, mesmo na presença de oxigênio (BERTOUT, PATEL, SIMON 2008). Hoje sabe-se que as células tumorais hipóxicas mostram mudança metabólica de respiração aeróbica mitocondrial para o processo de glicólise anaeróbica (KHAN, et al. 2017; GILKES, et al. 2014). Na hipóxia observa-se um aumento de absorção da glicose a partir do aumento da expressão da proteína transportadora de glicose (GLUT1) e enzimas glicolíticas induzidas pela atividade transcricional dos fatores induzidos por hipóxia (HIFs) (ATA, ANTONESCU, 2017).

Em normóxia o HIF é dificilmente detectável porque é alvo de destruição rápida pela pVHL (proteína de von-Hippel-Lindau – proteína supressora de tumor) e pela enzima proil hidroxilase. Essa, na presença de oxigênio, hidroxila a subunidade HIF-1 α e em seguida a pVHL

adiciona resíduos de poliubiquitina, assim direcionando-a para destruição via proteossoma. Na ausência de oxigênio, a prolil hidroxilase não consegue hidroxilar o HIF-1 α que, então associa-se à subunidade HIF-1 β , recrutam o co-fator p300 e formam um complexo de transcrição que se liga aos elementos de resposta à hipóxia (HRE-*hypoxic response elements*), resultando no aumento de transcrição de genes (BURROUGHS et al., 2014).

A proliferação celular acelerada de células tumorais, combinada com uma estrutura anormal dos vasos sanguíneos tumorais resultam em regiões hipóxicas dentro de tumores sólidos, onde as distâncias inter capilares são maiores do que a distância de difusão do Oxigênio (100-200 μ m) (SORG et al. 2008) (Fig. 3). Pacientes cujos tumores primários são pobremente oxigenados possuem risco aumentado de desenvolverem metástases (OSINSKY, ZAVELEVICH, VAUPEL, 2009). As células tumorais se adaptam ao ambiente hipóxico pela indução da expressão de fatores induzidos por hipóxia 1 e 2 (HIF-1 e HIF-2), que são fatores de transcrição para diversos genes pró-angiogênicos, principalmente o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (JOYCE, POLLARD, 2012).

Figura 3: O aumento do tumor leva à vascularização desorganizada em regiões de baixa oxigenação, aumentando a agressividade tumoral, resistência a diferentes modalidades terapêuticas e mau prognóstico para os pacientes. Imagem modificada de RAMACHANDRAN, et al 2015.

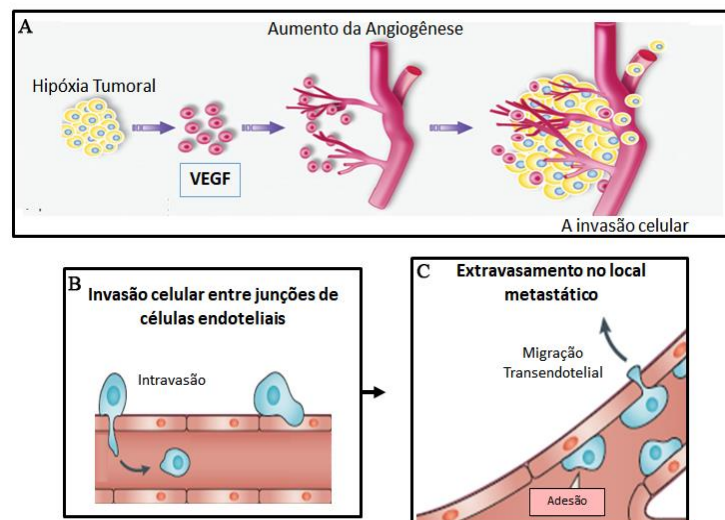


1.2 ANGIOGÊNESE TUMORAL

A angiogênese é o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (ZHAO, ADJEI, 2015) (RAHIMI, 2012). Nos vasos sanguíneos existem células aderidas na região extracelular, denominado pericito, cuja função é manter a estabilidade do vaso sanguíneo e controle da permeabilidade (GERHARDT, SEMB, 2008). Antes da proliferação do endotélio,

há uma desestabilização das interações entre a célula endotelial e os pericitos: a hipóxia induz óxido nítrico sintase (NOS) e aumento do VEGF, assim os vasos se dilatam em resposta ao óxido nítrico (NO) e o VEGF interrompe os contatos entre as células causando aumento da vasopermeabilidade (Fig. 4A) (CLAPP et al. 2009). Depois que as células tumorais conseguem intravasarem para a corrente sanguínea através das junções das células endoteliais (Fig. 4B), elas podem se espalhar por todo o corpo, deixando a circulação em um processo chamado extravasamento (Fig. 4C). Este caminho é feito pela adesão das células tumorais aos vasos sanguíneos através de receptores expressos na membrana plasmática, tanto na célula tumoral, quanto na célula endotelial. As células tumorais passam pela barreira da célula endotelial e transmigram para o sítio secundário num processo chamado de migração transendotelial (REYMOND, BORDA D'ÁGUA, RIDLEY, 2013).

Figura 4: Influência da hipóxia tumoral na angiogênese e migração celular. A) Aumento do VEGF e da angiogênese na hipóxia tumoral. B) Invasão tumoral através dos vasos sanguíneos. C) Extravasamento da célula tumoral para o nicho secundário. Adaptado de RAHIMI, 2012 e REYMOND, BORDA D'ÁGUA, RIDLEY, 2013



1.3 TRANSIÇÃO EPITÉLIO OU ENDOTELIAL PARA MESENQUIMAL, EMT e EndoMT

O processo de transição epitélio para mesenquimal, EMT (*Epithelial to Mesenchymal Transition*), está diretamente envolvido em diferentes etapas durante a metástase. Esse mecanismo induz a perda de adesão das células tumorais, as quais adotam propriedades mesenquimais e adquirem a capacidade migratória. Após a célula tumoral atingir o nicho secundário ocorre um processo reverso, a transição mesenquimal para epitelial, MET

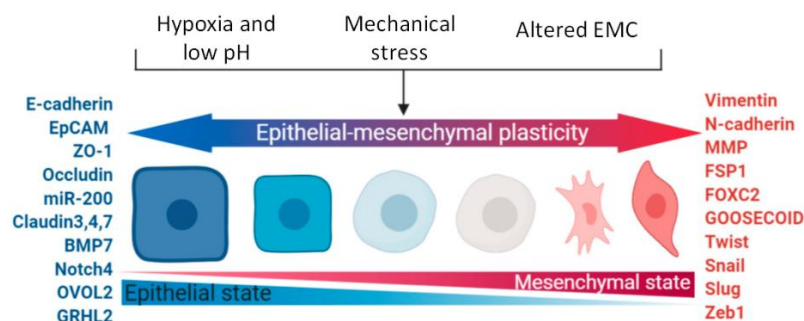
(*Mesenchymal to Endothelial Transition*) adquirindo novamente um fenótipo epitelial (LIMA et al., 2016). Esse mesmo mecanismo é caracterizado também para células endoteliais, chamado de transição endotelial para mesenquimal, EndoMT (*Endothelial to Mesenchymal Transition*), ou seja, ocorre a perda das características adesivas endoteliais e ganho de propriedades mesenquimais, ocorrendo a desestabilização dos vasos sanguíneos e promovendo a neovascularização (MEDICI, KALLURI, 2002).

Há diferentes expressões proteicas e fatores envolvidos nos processos EMT - EndoMT e MET que são estabelecidos como biomarcadores (Tabela 3). Entretanto as células não perdem e adquirem rapidamente marcadores EMT ou MET, mas sim ocorre um fenótipo intermediário ou híbrido entre os dois eventos que podemos chamar de plasticidade epitelial ou endotelial para mesenquimal, EMP (*Epithelial – mesenchymal plasticity*) (BATHIA et al., 2020) (Fig. 5)

Tabela 3: Comparações entre as características EMT e EndoMT. Adaptado de PLATEL et al., 2019; LIMA et al., 2016; MEDICI, KALLURI, 2012.

	EMT	EndoMT
Células	Epiteliais	Endoteliais
Mediadores Indutores	TGF- β , Wnt/ β -catenina, hipóxia, Noth, estresse oxidativo	TGF- β , Wnt/ β -catenina, hipóxia, estresse oxidativo, Noth
Marcadores epidermais e endodermis	E-caderina, N-caderina	VE-caderina, CD31/PECAM-1, CD31, colágeno tipo 4
Marcadores mesenquimais	Vimentina, α -SMA, FSP1, MMP-2 e 9	Vimentina, α -SMA, FSP1, MMP-2 e 9, Colágeno tipo 1 e 2, N-caderina
Fatores transcricionais	Slug, Snail-1 e 2, Twist	Slug, Snail-1 e 2, Twist,

Figura 5: Dinâmica entre EMT e MET: a plasticidade epitelial-mesenquimal. Adaptado de BATHIA et al., 2020.



A hipóxia também é conhecida como um indutor de EMT em diferentes tumores e a EndoMT. Já foi relatado o HIF1- α como regulador da via TGF- β / SMAD3 (*Suppressor of Mothers Against Decapentaplegic 3*) em pacientes com câncer de mama (TAM, WU, LAW,

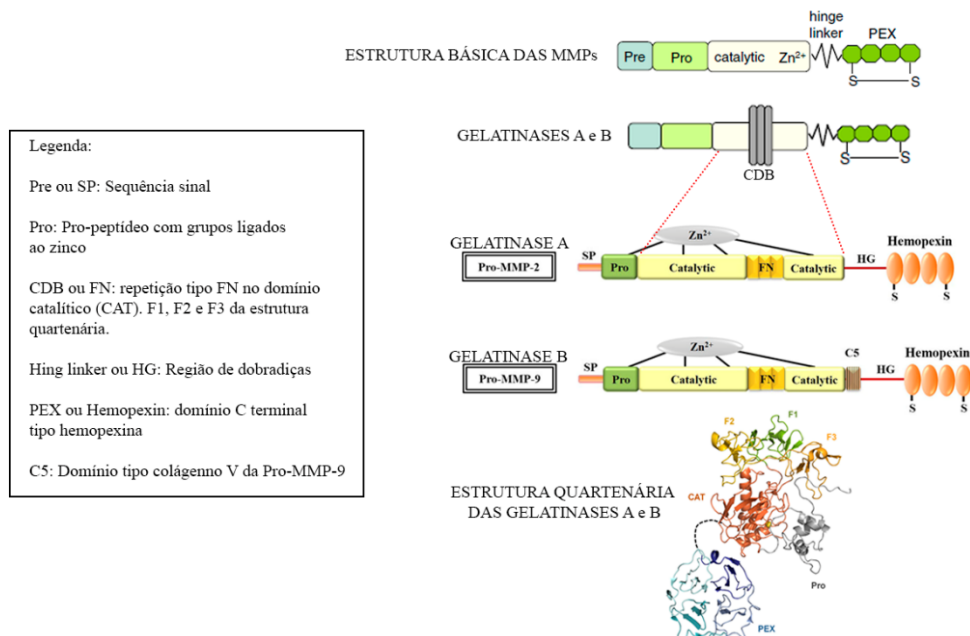
2020). A Endo-MT também está associado a transcrição de fatores Snail e Slug pela via TGF- β através da indução da hypoxia para conduzir a fase de abrotamento (*sprouting*) da célula endotelial durante a angiogênese (PLATEL et al., 2019).

1.4 METALOPREINASES OU METALOPROTEASES DE MATRIZ, MMPs

Durante a EMT e Endo/MT, as proteínas de matriz são degradadas pelas metalaproteínas de matriz (MMPs), como as gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9). As MMPs são da família da metaloproteínas dependente de zinco que participam da degradação dos componentes da MEC, citocinas, fatores de crescimento, promovendo o crescimento tumoral e neovascularização (QUINTERO-FABIÁN et al., 2019).

A estrutura geral da família das MMPs inclui um peptídeo sinal para secreção, um domínio pró-peptídico para latência enzimática, um domínio catalítico com um local de ligação ao zinco e um domínio C-terminal do tipo hemopexina (PEX), presente na maioria das MMPs, cuja função está relacionada ao reconhecimento do substrato. As gelatinases MMP-2 e MMP-9, metalaproteases secretetadas, contém domínios repetitivos tipo fibronectina (FN) que pode ser denominado CBD (*collagen binding domain*), a qual interage e degrada o colágeno tipo IV. Vale ressaltar que a MMP-9 contém mais um domínio tipo colágeno tipo V (BAUVOIS, 2012) (Fig. 6).

Figura 6: Esquema das estruturas das MMPs. Adaptado de BAUVOIS, 2012; HSIO et al., 2019; RADISKY, RAEESZADEH-SARMAZDEH, RADISKY, 2017.

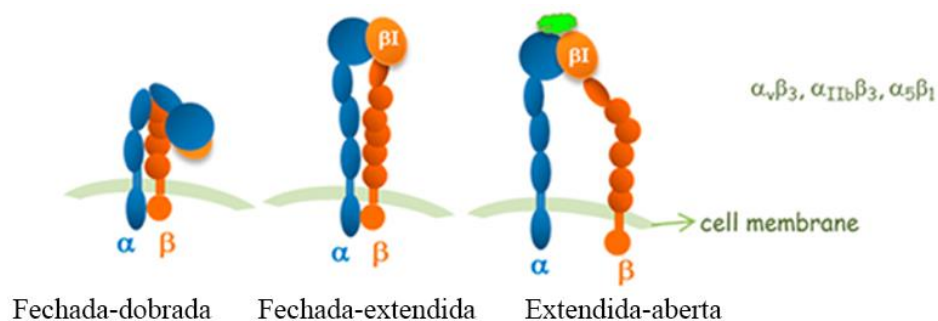


Há um aumento da MMP-2 e MMP-9 em hipóxia em câncer de mama e de cólon levando ao remodelamento da MEC e alinhamento das novas fibrilas de colágeno, de forma a facilitar a migração das células tumorais em direção aos sítios metastáticos (MUÑOZ-NÁJAR et al., 2006; CHOI et al., 2011). Após a degradação da lamina basal pelas gelatinases, outras moléculas de matriz são substituídas, como o colágeno tipo I e II, e fibronectina. O colágeno tipo I está associado com a indução de EMT e Endo/MT pela ativação de receptores, como a integrina $\alpha_2\beta_1$. A fibronectina induz a pós Endo-MT através da sinalização da integrina $\alpha_5\beta_1$, a qual promove reorganização no citoesqueleto (MEDICI, KALLURI, 2012; BATHIA, et al., 2020).

1.5 AS INTEGRINAS E SUAS INTERAÇÕES

As integrinas são receptores heterodiméricos glicoproteicos, formados por duas subunidades, α e β , em combinações de 18 subunidades α e 8 subunidades β e resultando 24 dímeros diferentes de integrinas. Elas são moléculas sinalizadoras bidirecionais denominada como *outside-in signalling* e *inside-out signalling*. A sinalização *outside-in* é caracterizado pela ativação da integrinas por sinais de origem extracelular, levando a proliferação e migração celular. Já a sinalização *inside-out* ocorre a partir de sinais internos da célula, alterando afinidade entre as integrinas com seus ligantes (HAMIDI, IVASKA, 2018). Curiosamente, as integrinas podem apresentar três estados conformacionais, dobrada (inativa), fechada-estendida ou aberta-estendida. Esses estados podem ser correspondentes as diferentes afinidades e ocupação dos ligantes com as integrinas e gatilhar as diferentes sinalizações (TOLOMELLI et al., 2017) (Fig.7).

Figura 7: Esquema dos possíveis estados conformacionais das integrinas. Adaptado de TOLOMELLI et al., 2017.

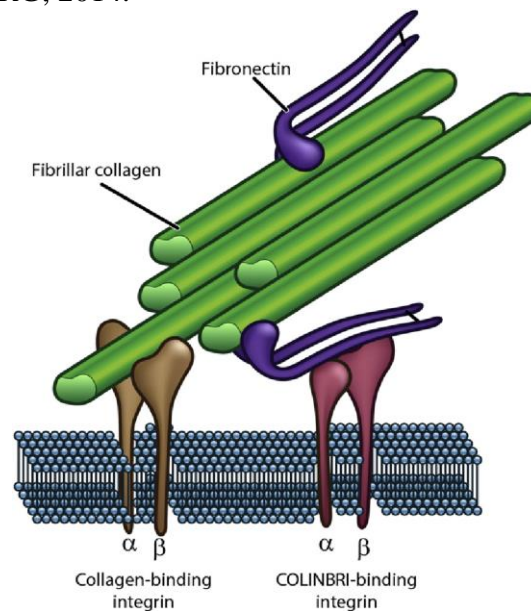


As integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ se ligam a proteínas de matriz que possuem o motivo

tripeptídico, RGD (Arg-Gly-Asp), como é o caso da FN (fibronectina) e VN (vitronectina), responsáveis pela adesão celular (MOMIC, KATZEHENDLER, 2014; BARCZYK, CARRACEDO, GULLBERG, 2010).

A FN e a VN possuem regiões específicas de interação com o colágeno, assim ambas proteínas de matriz formam ligações intermediários entre colágeno-célula, além da integrina $\alpha_2\beta_1$ se ligar preferencialmente no colágeno (ZELTZ, ORGEL, GULLBERG, 2014; MORITZ et al., 2022) (Fig.8). Essas moléculas são componentes-chaves durante a migração celular nas diferentes etapas na progressão e metástase tumoral, desta forma demonstra um grande interesse de desenvolvimento de inibidores de integrinas que possam inibir sua função celular (HAMIDI, IVASKA, 2018)

Figura 8: Interação entre o colágeno e a célula formada pela ligação direta ou indireta. A ligação direta é mediada pela integrina e o colágeno, e ligação indireta é mediada por uma ponte (FN) entre a integrina e colágeno denominado COLINBRI (*COL*lagen *IN*tegrin *BR*Idging) por ZELTZ, ORGEL, GULLBERG, 2014.



1.6 AS INTEGRINAS EM AMBIENTE HIPÓXICO

A metástase de câncer de mama está correlacionada com aumento de integrinas em hipóxia. BROOKS et al., (2016) demonstraram que a subunidade da integrina α_6 é um gene alvo de HIF na linhagem celular de tumor de mama MDA-MB-231. CHUNG et al., (2004) também mostraram a importância da integrina $\alpha_6\beta_1$ em condições de hipóxia e a proteção contra a apoptose de células tumorais MDA-MB-435. Além disso, a hipóxia também influencia na determinação do nicho pré-metastático pelo recrutamento de células tronco derivadas da medula

óssea em modelos experimentais de câncer de mama, resultando em aumento de metástase linfática e vascular (CHATURVEDI et al., 2013).

DUNN et al., (2009) estudando fatores secretados envolvidos na indução da metástase óssea de tumor de mama, questionaram se a sinalização do HIF-1 α e do TGF- β promoviam metástase de forma sinérgica ou independente. A inibição desses genes individualmente provocou diminuição de metástases ósseas, sem efeito adicional do duplo bloqueio *in vivo*. As formas mais agressivas de câncer de mama invasivo, principalmente o fenótipo TNBC, resultam em maior mortalidade devido aos casos metastáticos (GARCIA et al., 2021).

Ao silenciar o gene da integrina α_5 de células MDA-MB-321, observaram que houve uma inibição da invasão e da motilidade das células em uma matriz tridimensional de colágeno e fibronectina (JU et al. 2017). Os mesmos autores fizeram em um estudo em larga escala utilizando bancos de dados como o *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), selecionaram o gene da integrina α_5 como o de maior correlação com os genes induzidos por HIF-1. Esse resultado foi validado pela confirmação dos altos níveis de expressão da integrina $\alpha_5\beta_1$ em um painel de 20 linhagens diferentes de câncer de mama expostas a 20% e 1% de O₂.

Outros autores demonstraram o aumento na expressão da integrina $\alpha_v\beta_3$ pela exposição de células tumorais à hipóxia, o qual pode levar ao aumento de proteínas de matriz resultando em um fenótipo rígido e fibrose (DAHL et al., 2005). Estes resultados evidenciam a importância da MEC e dos receptores de adesão na progressão tumoral.

1.7 A CULTURA TRIDIMENSIONAL E AS INTEGRINAS EM CULTURA 3D

Inicialmente, meados do século XX, Harrison foi o cientista pioneiro para o cultivo celular, técnica atual de cultura 3D conhecida como *Hang Drop*. Em 1923, Alex Carrel, aprimorou o cultivo celular em monocultura, utilizando garrafa para adesão, conhecido como Flask Carrel e se dedicou a estudar sobre assepsia (BRESLIN, DRISCOLL, 2013). Em torno de 1950 foram feitos vários ensaios *in vitro* com célula primária e tumoral utilizando diferentes drogas. Entre 1970-1980, outros modelos embebidos em solução *soft-agar* começaram a ser utilizados para estudo *in vitro* (HICKMAN et al. 2014). Assim a cultura 3D foi se perdendo até que nos meados de 2000, a pesquisadora norte americana Mina Bissel desenvolveu a cultura 3D com células mamárias a partir de células epiteliais embebidas em matrigel (BISELL et al. 2002)

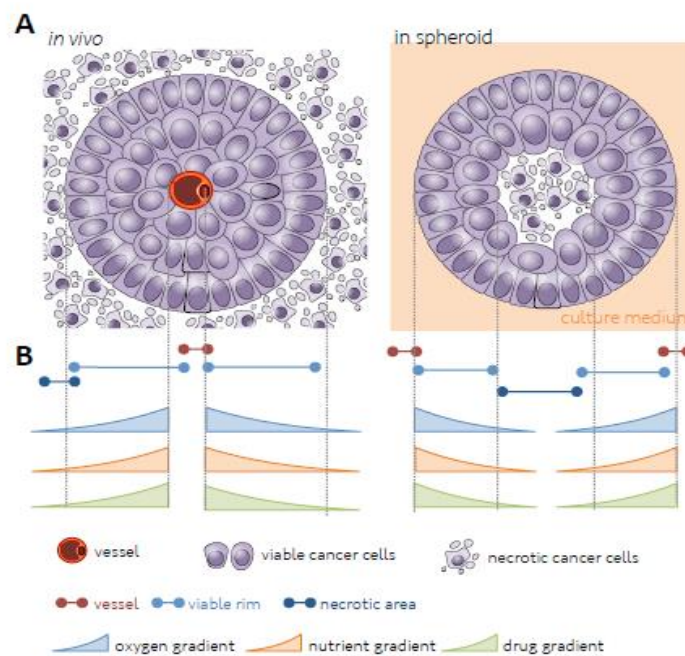
Para uma melhor compreensão do câncer e seleção de fármacos anti-tumorais e anti-angiogênicos, a cultura 3D reflete uma maior relevância fisiológica de modelos *in-vitro*,

mimetizando melhor o ambiente *in-vivo*. Os modelos de cultura 3D podem representar com uma maior complexidade as diferentes etapas da progressão tumoral na proliferação, migração e invasão de células tumorais e endoteliais (KATT et al., 2016; STATON et al., 2009).

A cultura 3D pode ser formada por modelos esféricos ou aglomerados compactos, nos quais apresentam interações célula-célula e célula-MEC, capazes de criarem micro tecidos com atividade metabólica controlada por mecanismos de difusão de nutrientes e oxigênio, semelhante aos tumores avasculares. Essas condições simulam a sensibilidade do tumor a medicamentos anticâncer e conseqüentemente sua resistência (NAPOLITANO et al., 2007; SHOVAL, et al., 2017; BADEA, et al., 2019) (Fig. 9).

Os esferóides provenientes de células endoteliais são utilizados para uso em aplicações como formação de tecidos pré-vascularizado. O modelo de brotamento e migração endotelial a partir da cultura 3D da célula endotelial demonstram mais ferramentas para estudar o início da angiogênese (VAKHRUSHEV et al., 2022).

Figura 9: Organização espacial da cultura 3D comparada com o microambiente tumoral *in-vivo*, mostrando a difusão dos nutrientes, oxigenação e local que o fármaco pode ser encontrado. (STADLER et al., 2015)



As integrinas estão envolvidas em diferentes etapas da cultura 3D, por exemplo, subunidade β_1 está envolvida no crescimento celular de forma dispersa e não aglomerada, como ocorre em monocamada, em diferentes tumores de cultura 3D (HOWE, ADDISON, 2012).

FISCHBACH et al., (2009) observaram o aumento da adesão e proliferação das células

3D de carcinoma oral escamosa (OSSC) em uma proteína modificada em RGD, destacando as possíveis ativações das integrinas que se ligam a esse motivo adesivo.

Além disso, já foi relatado que a via β_5 -Src em TNBC está relacionado com adesão e migração através do estudo do modelo 2D e 3D. Além de silenciar a subunidade β_5 e utilizar um inibidor RGD em cultura 2D, testaram um outro inibidor para Src em cultura 3D. Foi observado a diminuição da taxa de dissiminação da cultura 3D no coating de FN (PARK, HELFMAN, 2019). Desta maneira entendemos importância dos estudos com inibidores das integrinas e proteínas relacionada para entender melhor o seu papel nos diferentes modelos.

1.7 INIBIDOR DA INTEGRINA $\alpha_v\beta_3$

Embora a integrina $\alpha_v\beta_3$ está envolvida em várias patologias, como o câncer, até o momento nenhum antagonista foi aprovado após o estudo da terceira fase em humanos.

Pacientes com glioblastoma foram tratados com cilengtide, porém não houve o aumento da taxa de sobrevivência desses pacientes (GERSTNER et al., 2015). Esse composto cíclico e sintético que contém RGD é inibidor para integrina em subnanomolar para a integrina $\alpha_v\beta_3$, nanomolar para $\alpha_v\beta_5$ e alta seletividade para o receptor plaquetário para integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (MAS-MORUNO, RECHENMACHER, KESSLER, 2010)

Pacientes com tumores sólidos, como o câncer de mama, também foram tratados com o cilengtide, em um estudo da fase I, após serem diagnosticados com metástases. De doze pacientes, um paciente conseguiu uma resposta parcial à terapia e cinco pacientes apresentaram doença estável como melhor resposta (HADDAD et al., 2017).

É evidente que ainda existe a falta de compreensão entre as integrinas e antagonistas. Uma das possibilidades de resposta dessa lacuna é a capacidade de antagonistas induzir mudança conformacional no receptor e adotar um estado de ligante de alta afinidade. As pequenas moléculas TDI-4161 e TDI-3761 inibem adesão da célula embrionária de rim (HEK-293) no coating de fibrinogênio, mas não induzem uma grande mudança conformacional da integrina $\alpha_v\beta_3$ (LI et al., 2019). Na figura 10 podemos observar a mudança conformacional das integrinas de diferentes fármacos e inibidores da integrina $\alpha_v\beta_3$.

Farmacologicamente, os ligantes são classificados de acordo com ação dos receptores. Os agonistas são componentes que se ligam aos receptores e mimetizam a sinalização endógena. Os agonistas parciais possuem menor capacidade de ativar o receptor e a transdução de sinal associada, enquanto os agonistas inversos são componentes que podem estabilizar o receptor e inativar sua conformação. Entretanto algumas revistam aceitam o termo antagonistas, as quais

se ligam nos receptores e bloqueiam a interação com agonistas endógenos e não induz nenhuma ativação do receptor (Fig.11). É crucial investigar esses novos *insights* das integrinas, principalmente após a interação de um agonista/antagonista, e a relação com resposta biológica celular, como adesão, migração, tráfico de integrina, internalização e via de sinalização (TOLOMELLI et al., 2017).

Figura 10: Microscopia Eletrônica da mudança conformacional da integrina. Adaptado de LI et al., 2019

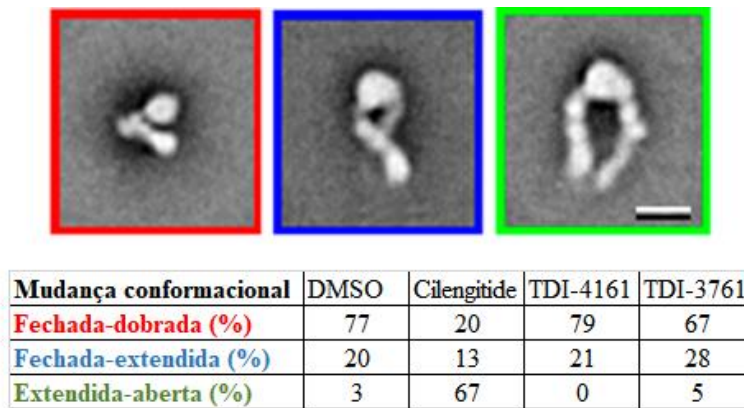
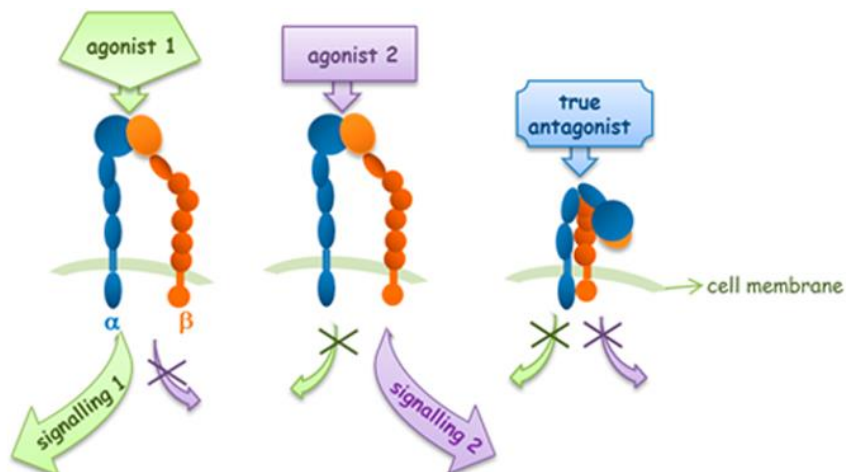


Figura 11: Comportamento das integrinas na ligação de agonistas e antagonista (TOLOMELLI et al., 2017).



1.8 DESINTEGRINAS

As desintegrinas, originadas de veneno de serpente, são inibidores naturais de integrinas devido o motivo tripeptídico presentes nas próprias proteínas e estão dentro da classificação das metaloproteinases de veneno de serpente (SVMPs) (CALVETE, 2013; FOX, SERRANO,

2008). A classe mais comum de desintegrinas é formada por proteínas monoméricas que contêm o motivo adesivo RGD e são capazes de inibir a adesão celular a componentes da MEC. Devido à sua elevada capacidade de inibir a migração celular, diversos estudos mostraram o potencial destas proteínas para a prevenção do desenvolvimento de metástases (MACÊDO et al. 2015; RAMOS et al. 2008).

A DisBa-01 (*Disintegrin of Bothrops alternatus*) é uma proteína recombinante derivada do veneno da serpente *Bothrops alternatus* (urutu-cruzeiro) que possui o motivo RGD na região C-terminal, formando um *loop* de interação com a integrina $\alpha_v\beta_3$ (RAMOS et al. 2008).

A DisBa-01 inibiu a proliferação em células endoteliais humanas (HMEC) (RAMOS et al., 2008), de células tumorais de próstata e mama (DU-145 e MDA-MB-231) (SELISTRE-DE-ARAÚJO et al., 2010), além de inibir a angiogênese no modelo da esponja em rato (CASSINI-VIEIRA et al., 2014). Em outro estudo, causou aumento da adesão focal de células de uma linhagem celular de carcinoma oral escamosa (OSCC) altamente metastática provocando a perda do direcionamento da migração, em um ambiente rico de FN (MONTENEGRO et al., 2017).

Células tumorais de mama de camundongo (4T1) e fibroblastos de camundongo (L929) tratadas com a DisBa-01, não entram em apoptose, ao contrário, iniciam um programa de autofagia, prolongando a sobrevivência celular (LINO et al., 2019). A DisBa-01 colocaliza-se tanto com a integrina $\alpha_v\beta_3$, quanto com a integrina $\alpha_5\beta_1$ em HUVEC, porém de forma diferente.

A colocalização da DisBa-01 com a integrina $\alpha_v\beta_3$ é de forma dispersa na célula. Já a colocalização com a integrina $\alpha_5\beta_1$ é observada de maneira aglomerada, semelhante ao observado entre a DisBa-01 e o VEGFR2 em HUVEC (CASALI et al., manuscrito em preparação) (DANILUCCI et al., 2019). Além disso, o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ pela DisBa-01 é suficiente para inibir a sinalização mediada pelo VEGFR2 em HUVEC. Apesar de induzir a fosforilação do VEGFR2 (Y1054+Y1059), a proliferação e a migração das células endoteliais são inibidas pelo bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ (DANILUCCI et al., 2019). Estes resultados demonstram o potencial desta desintegrina para a compreensão de processos celulares complexos que ocorrem durante a progressão tumoral.

2. JUSTIFICATIVA

Todos os estudos descritos *in-vitro* com o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ com o tratamento da DisBa-01 foram realizados em normóxia. No entanto, não se conhece o efeito desta desintegrina ao bloquear a integrina $\alpha_v\beta_3$ em hipóxia, condição mais frequentemente associada a tumores

sólidos como o de mama, e a cultura 3D.

3. HIPÓTESE

Acreditávamos que em condições de hipóxia, a migração das células MDA-MB-231 e HUVEC em cultura 2D e 3D seriam inibidas após o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$, em maiores concentrações da DisBa-01. Esse achado é afirmativo dependente do modelo migratório em cultura 2D ou 3D sob baixa oxigenação.

4.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Investigar os mecanismos pelos quais a integrina $\alpha_v\beta_3$ regula a migração celular tumoral e endotelial, a angiogênese, citoesqueleto no microambiente tumoral em condições de hipóxia comparado à normóxia.

4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Analisar atividade das gelatinases, MMP-2 e MMP-9, em ambiente hipóxico com o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ das células MDA-MB-231;

Determinar o perfil proteico da subunidade da integrina β_3 das células MDDA-MB-231 em normóxia e hipóxia por citometria de fluxo e as subunidades α_5 , β_1 , β_3 e a integrina $\alpha_v\beta_3$ da HUVEC com e sem o tratamento da DisBa-01 por 5 minutos em normóxia;

Identificar a morfologia celular das células MDA-MB-231 e HUVEC após o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ por 4h com o tratamento da DisBa-01 em normóxia e hipóxia;

Verificar o mecanismo do bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ na migração das culturas 3D proveniente das células MDA-MB-231 e HUVEC em normóxia e hipóxia;

Avaliar se ocorre interação direta entre a DisBa-01 com as proteínas de matriz, FN e VN, e o VEGFR2 por ressonância plasmônica de Superfície (SPR – *Surface Plasmon Resonance*);

Observar se a DisBa-01 e o complex DisBa-01- integrina $\alpha_v\beta_3$ colocaliza com a FN e VN na HUVEC;

5. MÉTODOS

5.1 Expressão e Purificação da DisBa-01

A expressão e purificação da DisBa-01 foi estabelecida por RAMOS *et al.* (2008). Resumidamente, a biblioteca de cDNA foi produzida a partir da glândula venenífera de *Bothrops alternatus*. Os plasmídeos (pET-28a com o cDNA da desintegrina) foram inseridos em células de *Escherichia coli* DH5- α , selecionados e utilizados para transformar a linhagem de *E.coli* BL21 (DE3) (Novagem – Madison, WI, USA).

A proteína foi expressa e as células lisadas em tampão de ligação (*binding buffer*; 40 mM Tris, 0,5M NaCl e 5mM imidazol, pH 7,9) e rompidas por sonicação (6 vezes com intervalo de 30 segundos, na amperagem 20A). Em seguida, o lisado foi centrifugado a 29338 g por 15 minutos a 4°C, ressuspenso em *binding buffer* acrescido de ureia 6M, incubado por uma hora a 4 °C, centrifugado a 29338 g por 15 minutos a 4°C. Em seguida, a proteína foi filtrada em papel de filtro e mantida em *freezer* -20 °C para posterior purificação.

A proteína foi purificada em processos cromatográficos, usando coluna de afinidade (HIS-Select® HF Nickel Affinity Gel - Sigma-Aldrich). A coluna foi equilibrada com tampão *binding buffer* e a amostra foi aplicada. Em seguida, a proteína foi eluída em dois passos nos seguintes tampões Tampão de Lavagem (*Washing Buffer* 40 mM Tris, 0,5 M NaCl, 10 mM imidazol, pH 7,9) e Tampão de Eluição (*Elute Buffer* 40 mM Tris, 0,5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7,9).

Para refinar a purificação proteica, a amostra foi aplicada na coluna cromatográfica de troca aniônica Tricorn™ Mono-Q 5/50 GL (GE Healthcare Life Sciences), acoplada ao cromatógrafo ÄKTA® pure 25 L (GE Healthcare Life Sciences). A cromatografia foi realizada sob um fluxo constante de 1 mL/min com a coluna pré-equilibrada em tampão A (10 mM Tris, pH 8,6). A eluição das proteínas que se ligaram à resina apresentou o modo de análise isocrática, ou seja, a fase móvel permanece uma proporção constante da mistura do tampão A com o tampão B (10 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8,6).

Após a purificação da DisBa-01 analisada por SDS-PAGE 15%, a amostra foi dialisada contra água e concentrada em um volume final de 1 mL para quantificação por detecção colorimétrica, utilizando o *kit* Pierce™ BCA *Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific).

5.2 Cultivo celular em condições de normóxia e de hipóxia

Foram usadas as seguintes linhagens celulares: i) célula de adenocarcinoma triplo negativo de mama MDA-MB-231, ii) células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Nutricell), pH 7.0, contendo soro fetal bovino a 10% (FBS) e L-glutamina e antibióticos (penicilina/streptomicina - Vitrocell). As células foram mantidas em hipóxia e normóxia no momento do experimento, em

incubadoras especiais em atmosferas contendo 1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂ a 37°C (H35 Hypoxystation, Don Whitley Sci., Bingley, UK), e 5% CO₂ a 37°C, respectivamente, conforme descrito por JU et al., 2017.

5.3 Migração Celular da MDA-MB-231 e HUVEC por *Wound Healing*

Foi cultivado 1×10^5 células da MDA-MB-231 e HUVEC em uma placa de 24 poços (KASVI) até atingir 90% de confluência. Em seguida foi feita uma risca central do poço, utilizando uma régua e uma pipeta de 200 µL e adicionado 10 µg/mL mitomicina-c (Sigma) por 4 horas para célula MDA-MB-231 e 2 horas para HUVEC. Após lavar o poço com PBS foi adicionado 0, 10, 100, 250, 500 e 1000 nM DisBa-01 em meio de cultivo com 10% SFB e levadas em normóxia e em hipóxia. As placas foram fotografadas com a câmera fotográfica AxioCam MRc Zeiss acoplada a um microscópio Axio Vert.A1 Zeiss, tirado 3 fotos em campos diferentes por poço no *zoom* de 10 x e nos tempos 0, 12, 24 e 48h. A análise dos resultados foi realizada com auxílio do software Image J, a partir da medida da área do risco utilizando a fórmula, $A_{\text{final}} \times 100 / A_{\text{inicial}}$ resultando o fechamento da fenda, ou seja, a taxa migratória. Nessa fórmula consideramos A a medida do contorno do risco e a A_{inicial} a média do contorno do risco que equivale 100% de abertura da fenda no tempo 0h. O experimento foi feito em triplicata com 3 eventos independentes.

5.4 Apoptose por citometria

Atividade apoptótica da célula MDA-MB-231 e HUVEC tratadas com a DisBa-01 em normóxia e hipóxia foi feita pelo kit PE-Annexin V Apotosis (BD Biosciences, Catalog Number: 559763). 1×10^5 células foram plaqueadas em placa de 24 poços com DMEM 10%, assim como descrito pelo método de *wound healing* e tratadas por 24 horas com a DisBa-01. As células controles foram mortas por aquecimento à 100°C por 5 minutos e levadas ao gelo rapidamente. As células foram incubadas por PE-Annexin V e 7-aminoactinomycin D (7ADD) por 15 minutos à 4°C. As células tratadas com DisBa-01 (0, 100 e 1000 nM) foram incubadas com PE-Annexin V e 7ADD, centrifugadas a 400 g e ressuspensas em tampão. A análise foi feita por citometria de fluxo (BD Accuri™ C6, BD Biosciences).

5.5 Migração Celular da MDA-MB-231 em câmara de Boyden – Migração *transwell*

Foram utilizados insertos de 8µm (Greiner) e placas de 24 poços (KASVI). As células MDA-MB-231 foram ressuspensas com meio de cultura sem SFB, diluídas (1×10^5 células) e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente com 0, 10, 100, 250, 500 e 1000 nM da

DisBa-01. Em seguida, as células foram adicionadas no compartimento superior do inserto e inseridos na placa de 24 poços contendo 10% SFB no compartimento inferior, por 16 horas em normóxia e hipóxia. As células da face superior do inserto foram retiradas com hastes flexíveis com algodão e as células que migraram (face inferior do inserto) foram fixadas com paraformaldeído 3,7% por 10 minutos, lavadas com PBS, incubadas com DAPI por 10 minutos e lavadas novamente com PBS. As membranas foram retiradas dos insertos para a montagem de lâminas e as imagens foram adquiridas e analisadas no microscópio de alta resolução ImageXpress, em um aumento de 10 x e quantificada pelo *software* MetaXpress pelo módulo 6 de Análise *Multiwavelength Cell Scoring: Total Cell*. O experimento foi feito em triplicata ou duplicata em 3 eventos independentes.

5.6 Transmigração da MDA-MB-231 através de uma camada de célula endotelial (HUVEC) em câmara de Boyden

Foram utilizados insertos de 8µm (Greiner) em placas de 12 poços (KASVI). Foram plaqueadas 8×10^4 células endoteliais (HUVEC) para a formação da monocamada em meio de cultura celular suplementado com 10% de FBS nas porções superior e inferior do inserto por 48h em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

No dia do ensaio, as células MDA-MB-231 foram marcadas com 2,5 µM CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (C34554, ThermoFisher). Em seguida as células tumorais ($0,6 \times 10^5$) marcadas com CFSE foram incubadas por 30 minutos com 0, 10, 100 e 1000 nM da DisBa-01 em meio de cultivo sem SFB em temperatura ambiente. Depois, as células tratadas foram adicionadas na parte superior dos insertos, previamente recobertos pela monocamada de HUVEC. O quimioatraente (10% de FBS) foi adicionado somente no compartimento inferior do inserto e o sistema foi incubado por 16 horas em normóxia e hipóxia. As células da face superior foram retiradas com hastes flexíveis com algodão e as células que migraram foram fixadas com paraformaldeído 3,7% por 10 minutos, lavadas com PBS e incubadas com DAPI por 10 minutos e lavadas novamente com PBS. Os filtros foram retirados dos insertos para a montagem de lâminas e as imagens foram adquiridas e analisadas no microscópio de alta resolução ImageXpress, em um aumento de 10 x e quantificada pelo *software* MetaXpress - módulo 6 de Análise *Multiwavelength Cell Scoring: Total Cell – Positive W2*. O experimento foi feito em triplicata em 2 eventos independentes e duplicata em 1 evento independente (n=3).

5.7 Determinação do perfil protéico de integrinas por citometria de fluxo

1×10^6 células MDA-MB-231 e HUVEC foram incubadas com mitomincina-c, como

descrito no item 5.3 e tratadas com 1000 nM da DisBa-01 por 24 horas em normóxia e hipóxia. Em seguida, em gelo, essas células foram lavadas com PBS e desaderidas da placa de 3 poços (KASVI) por ação mecânica com o *cell scraper* (KASVI). Após a centrifugação foi adicionado o anticorpo anti β_3 (ab11992, Abcam) por 45 minutos nas células em gelo. As células foram centrifugadas, lavadas com PBS, centrifugadas novamente para retirar o excesso de marcador e incubadas com anti-IgG marcado com isotiocianato de fluoresceína alexa flúor 488 (ab11008, ThermoFisher) por 45 minutos em gelo e na ausência de luz. As células foram novamente lavadas por centrifugação com PBS e analisadas em um citômetro de fluxo (BD Accuri). Também foi feita outra análise com a HUVEC com o tratamento da DisBa-01 (1000 nM) por 5 minutos para verificar a quantidade proteica da subunidade α_5 , β_1 , β_3 e a integrina $\alpha_v\beta_3$.

5.8 Zimografia

Foram coletados os sobrenadantes dos experimentos de migração e para quantificação de proteínas através do kit BCA™ Protein Assay Kit (Pierce). Em seguida foi adicionado nas amostras (5 a 7 μ g) o tampão da amostra (125 mM Tris, pH 6.8; 4% SDS; 2% glicerol; 0,03 mM Azul de Bromofenol) sem β -mercaptoetanol ou DTT e aplicadas no gel de poliacrilamida a 10%, com adição de 0,1 % de gelatina. Após a eletroforese, o gel foi lavado e incubado por 18-20 horas a 37 °C em tampão contendo 50 mM Tris, 5 mM CaCl₂, 0,02% de NaN₃ e 10 mM de ZnCl₂. O gel foi corado com *Comassie Blue Brilliant R-250* e descorado em ácido acético:metanol:água (1:4:5) (CLEUTJENS et al., 1995). Em seguida, o gel foi fotografado no CHEMIDOC (Biorad) no Laboratório de Fisiologia e Biofísica Muscular e as bandas de atividade gelatinolítica foram quantificadas no ImageJ.

5.9 Ensaio de morfologia

Células MDA-MB-231 (1×10^4) e HUVEC (3×10^4) foram plaqueadas numa placa preta de 96 poços (Corning 3603) *overnight* a 37 °C, 5% CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com DisBa-01 (10, 100, 1000 e 2000 nM) por 4 horas em DMEM suplementado com 10% FBS. As células foram fixadas com paraformaldeído a 3.7% por 10 minutos, permeabilizadas usando 0.3% Triton X-100 por 5 minutos e marcadas com Alexa Fluor® 488 *Phalloidin* (*F-actin dye*, Thermo Fisher Scientific, Catalog Number: 12379) em DAPI-PBS (1:40) por 30 minutos. As imagens foram fotografadas usando ImageXpress (Molecular Devices) e analisadas a área das células pelo módulo Multi Wavelength Cell Scoring ou pelo imageJ.

5.10 Tubulogênese

A capacidade de formação do tubo foi feita com HUVEC incubadas sobre uma camada de matrigel reduzido em fatores de crescimento (Matrigel[®] Growth Factor Reduced-GFR Basement Membrane Matrix, *LDEV-Free; Corning[®] - 354230). O matrigel foi descongelado à 4 °C por 12 horas, diluído (1:1) em meio de cultura com 0,5% SFB e adicionado (35µL/poço) numa placa de 96 poços (KASVI); em seguida, a placa foi incubada por 1 hora a 37°C a 5% CO₂. Foram adicionadas 3 x 10⁴ células/poço, tratadas previamente com 0, 10, 100, 250, 500 e 1000 nM da DisBa-01 por 30 minutos a temperatura ambiente e incubadas por 10 - 12 horas em normóxia e hipóxia. As imagens foram registradas com câmera fotográfica AxioCam MRc Zeiss acoplada a um microscópio Axio Vert.A1 Zeiss, tirando-se 2-3 fotos por poço, em campos diferentes e no zoom de 10 x. O experimento foi feito em triplicata com 3 eventos independentes e analisado pelo *software* Image-J, *pluggin* *Angiogenesis Analyzer* através dos parâmetros, *Total lenght, number of nodes, master junctions* e *Score*.

5.11 Cultura 3D

5.11.1 Padronização da cultura 3D

Para formação de cultura 3D foi utilizado um molde de silicone, *MicroTissue 3D Petri Dish micro-mold spheroids* - Sigma Z764019, para o cultivo de células MDA-MB-231 e HUVEC.

Etapa1 – *Preparação do material para o cultivo celular 3D*: Primeiramente, o micro molde foi lavado com extran 0,01% e água, em seguida foi feita a esterilização em autoclave. Também foi feita a esterilização da agarose ultrapura (Invitrogen, 16500100) da mesma maneira que o micro molde. A solução salina diluída em água estéril (0,9% NaCl) foi filtrada através de uma membrana de 0,22 µm esterilizada em autoclave. Por fim, 2% de agarose em 0,9% NaCl foi aquecida no micro-ondas para o preparado da agarose micro moldada.

Etapa 2 – *Molde de agarose*: foram adicionados 600 µL de agarose salina na parte central do molde de silicone. Após a solidificação do gel, foi retirado o molde de agarose e este foi acoplado a uma placa de 12 poços (KASVI), adicionando-se 700 µL de agarose salina em torno do molde de agarose.

Etapa 3 – *Equilíbrio do molde de agarose para o cultivo de cultura 3D*: Foi adicionado 1 mL/poço de PBS e incubado no máximo 15 minutos na estufa de 5% de CO₂, repetidamente 3x. Em seguida foi adicionado o meio base para cultivo de esferóide pelo mesmo tempo com ou sem matrigel (Matrigel[®] Growth Factor Reduced-GFR Basement Membrane Matrix,

*LDEV-Free; Corning® - 354230).

Tabela 4: Meio base da cultura 3D

Componente	[] Estoque	[] Final	5 mL
Ácido L Ascórbico (Sigma, A4403)	10 mg/mL ou 10000 µg/mL	50 µg/mL	25 µL
Albumina Humana	2,5 mg/mL	1,25 µg/mL	2,5 µL
PS (Penicilina/ Estreptomicina)	100x	1x	50 µL
ITS (Insulina, transferrina e selênio, LONZA 17838z)	100x	1x	50 µL
Matrigel Reduced (para MDA-MB-231 e HUVEC)	100%	7%	350 µL

Etapa 4 – *Cultivo celular para formação da cultura 3D no molde de agarose*: após a tripsinização, ressuspensão em meio de cultura comum e contagem de células por *trypan blue*, foram separadas diversas quantidades de células, para padronização. As células foram adicionadas num tubo de 15 mL (KASVI) com 10 mL de PBS e centrifugadas a 500 g por 7 minutos. Por cada molde de agarose foi adicionada uma quantidade de células em 120 µL de meio base por 15 minutos. Em seguida adicionou-se mais 80 µL de meio base, completando assim 200 µL de meio base de cultivo. O meio base foi trocado ou adicionado de 2 em 2 dias por 7-19 dias. O crescimento da cultura 3D foi monitorado pela captura de imagens e medido o diâmetro pela câmera fotográfica AxioCam MRc Zeiss acoplada a um microscópio Axio Vert.A1 Zeiss, Zeiss, em lente de 4x e 10x.

5.11.2 Remoção da cultura 3D do molde de agarose.

Após a formação da cultura 3D foi feita a fixação em 4% de paraformaldeído em PBS 1x por 15 minutos no micromolde de agarose. Em seguida as células da cultura 3D foram retiradas com jatos de PBS 1x e feito um *sandwich* entre agarose que mantém solidificada em altas temperaturas para histologia: foi adicionado 20 µL de 1% de agarose (A8455-Sigma) em 1 x PBS na tampa do tubo de 0,2 mL, previamente cortado a parte inferior. Em seguida a cultura 3D foi adicionada em cima da agarose solidificada com a tampa do tubo fechada. Por fim, foi adicionado mais 20 µL de 1% de agarose para a formação do *sandwich*.

A histologia foi feita no Laboratório de Patologia e Biocompatibilidade ou Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) na UFSCar.

- **Emblocamento:** Os *sandwichs* com a cultura 3D foram acoplados em cassetes e levados ao Processador de Tecido Automático (Lupect) para desidratação, clarificação e impregnação.

Para o emblocamento foi feito a desidratação da amostra em uma serie crescente de etanol, 70%, 80%, 90%, 100% (1), 100% (2), 100% (3); álcool/xilol, seguida da clarificação com xilol (1), xilol (2) e xilol (3) entre 30 min ou 1 hora, e finalmente a impregnação foi feito em dois banhos de parafina à 60 °C a cada 1 ou 2 h. A inclusão foi feita no dia posterior, adicionando a parafina previamente aquecida. No outro dia foi feito os cortes de 5-6 µm no micrótomo (Luptec) seguida de banho-maria à 40 °C e adicionadas nas lâminas.

- A coloração foi feita de acordo com as instruções do fabricante por H&E (Sigma) e Kit Tricrômio de Masson (EasyPath).
- A imagem foi feita a partir do microscópio de luz Olympus BX51 (Olympus, Dinamarca) acoplado a câmera de vídeo digital e com software Olympus DP2-BSW.

5.11.3 Migração Celular da cultura 3D da célula MDA-MB-231 e HUVEC em câmara de Boyden – Migração *transwell*

Foram utilizados insertos de 8µm (Greiner) e placas de 24 poços (KASVI). A cultura 3D foi ressuspensa e centrifugada a 1200 RPM por 5 minutos com meio de cultura sem SFB e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente com 0, 100 e 1000 nM da DisBa-01. Em seguida, a cultura 3D foi adicionada no compartimento superior do inserto e colocados na placa de 24 poços contendo 10% SFB no compartimento inferior do inserto, por 24 horas em normóxia e hipóxia. A cultura 3D foi retirada com jatos de PBS para posteriormente realizar a imunomarcagem. Para garantir a migração, foi utilizado hastes flexíveis com algodão para a limpeza de dentro do inserto. Em seguida os filtros foram fixados com paraformaldeído 3,7% por 10 minutos, lavados com PBS e incubados com DAPI por 10 minutos e lavados novamente com PBS. Os filtros foram retirados dos insertos para a montagem de lâminas e as imagens foram adquiridas e analisadas no microscópio ImageXpress, em um aumento de 10x seguida de quantificação pelo *software* MetaXpress pelo módulo 6 de Análise *Multiwavelength Cell Scoring: Total Cell*. Os experimentos foram feitos em duplicata em 3 eventos independentes.

5.11.4 Imunofluorescência

As culturas 3D foram ressuspensas dos insertos com jatos de PBS, centrifugadas (1200 RPM por 5 minutos) e fixadas com 4% paraformaldeído. Alternativamente, foram centrifugadas, ressuspensas em 3% BSA-PBS, colocadas em lâminas silanizadas por 6-24 horas e fixadas com 4% paraformaldeído por 10 minutos. Em seguida as células foram permeabilizadas com 0,3% Triton X-100 por 10 minutos e submetidas a três lavagens em PBS. Os aldeídos livres formados no processo de fixação foram bloqueados com 100 mM glicina por

5 minutos e os sítios inespecíficos foram bloqueados com 3% BSA-PBS por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as culturas 3D foram incubadas *overnight* com o anticorpo primário para $\alpha_v\beta_3$ (1:500, ABCAM – ab78289) ou colágeno tipo I (AB34710 – 1:5000). As culturas 3D foram submetidas a 4 lavagens com PBS e incubadas com o anticorpo secundário *anti-mouse* - FITC (1:1000, ABCAM ab6785) e *anti-rabbit* – APC (1:500, ABCAM ab130805) por 1 hora e marcadas com DAPI (1:10000) por 15 minutos, seguida de lavagens com PBS 1x. A cultura 3D foi transferida para montagem das lamínulas sobre lâminas com a solução de montagem Prolong TM Diamond Antifade Mount (Invitrogen). As imagens foram capturadas e documentadas utilizando o microscópio confocal Fluoview v. FV10, Olympus acoplado com o software F10, v.2.1. As imagens foram quantificadas pelo software FIJI-ImageJ, *plugin 3D view manager* para contagem dos núcleos e *threshold* após a imagem 3D para análise do colágeno e a integrina $\alpha_v\beta_3$.

5.12 Análise de Interação

5.12.1 Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR – *Surface Plasmon Resonance*)

A interação da DisBa-01 (0,1 – 30 μM) com as proteínas de matriz, fibronectina e vitronectina, e com o VEGF-R2 imobilizadas foi feita via SPR, no equipamento BIAcore T200 (UNIFESP - Departamento de Bioquímica, e Butantan e Laboratório de Imunoquímica, São Paulo).

As proteínas de matriz, fibronectina e vitronectina (Sigma, FN: F2518, VN: V0132), e VEGFR2 (Sino Biological, 10012- H02H) foram imobilizados no chip CM5 (GE Healthcare Life Sciences). Para as proteínas de matriz, FN e VN, foram imobilizados 60 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, já para o VEGFR2 foi imobilizado numa concentração de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Essas três proteínas foram imobilizadas em um tampão de acetato de sódio com os pHs ideais para cada proteína, após ter feito o pH Scouting.

Para obter a ligação máxima do ligante com o analito (proteína recombinante) em Unidade de Ressonância (RU), foi calculado o R_{max} teórico (50 RU):

$$R_{\text{max}} = \text{PM do analito} / \text{PM ligante} \times S_n \times R_L$$

sendo que PM é o peso molecular, S_n é a estequiometria proposta da interação (1:1) e R_L é o valor necessário para imobilização do ligante em RU.

Para ligação das proteínas com o chip foi utilizado o tampão 0,1M HEPES, pH 7.4, 0,15M NaCl, 0,005 (v/v) surfactante P20 (HBS – EP, GE Healthcare Life Sciences) a 25°C com o fluxo de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$.

O ajuste da curva de associação e dissociação foi obtido pelo software BIAevaluation 1.1, considerando-se a DisBa - 01 como monomérica e massa molecular de 12000 Da. O chip foi regenerado pela injeção de GlyHCl 2M, pH 2.0 por 10s. A dissociação entre a DisBa-01 e as proteínas foi calculada pelo software GraFit 5.0 ou Graphpad, utilizando a concentração molar x Unidade de Ressonância (RU).

5.12.2 Co-localização da DisBa-01 e do complexo DisBa-01- com a integrina $\alpha\beta_3$ com os componentes de matriz, FN e VN em HUVEC

As células foram plaqueadas (1×10^5) sobre lamínulas de 13 mm alocadas em uma placa de 24 poços e deixadas para aderirem overnight a 37°C em estufa 5% de CO₂. No dia seguinte, as células foram então incubadas por 2 minutos com a DisBa-01 marcada com Alexa Fluor 546, fixadas com 4% paraformaldeído em PBS 1X por 20 minutos, permeabilizada com 0,3% Triton X-100 por 10 minutos. Os aldeídos livres formados no processo de fixação foram bloqueados com 100 mM glicina por 5 minutos e os sítios inespecíficos foram então bloqueados com BSA 2% em PBS 1X por 1 hora à temperatura ambiente.

Em seguida, as células foram incubadas overnight com o anticorpo primário para $\alpha\beta_3$ (abcam – ab78289), fibronectina (abcam - ab2413) e vitronectina (abcam ab45139). No dia seguinte, após a lavagem com PBS 1x, as células foram incubadas com anticorpos secundários, anti-mouse FITC (abcam – ab6785) e goat anti-rabbit Alexa 633 (Thermo Fisher Scientific – A21070).

Finalmente, procedeu-se com a montagem das lamínulas sobre lâminas com a solução de montagem Prolong™ *Diamond Antifade Mount* (Invitrogen) e selagem com esmalte cosmético. As lâminas foram observadas o microscópio confocal Axio Observer (Zeiss, Jena, Germany), Sistema LSM 780, software Fluoview FV10 (Olympus), 2.10 v. no Hospital de Amor – Barretos, SP, nas mesmas intensidades e ganho do laser para as diferentes fluorescências num aumento de 63X e zoom de 2X. As imagens foram analisadas no programa FijiJ ImageJ.

5.13 Análise da EndoMT na HUVEC

1×10^5 células foram plaqueadas em lamínula de 13 mm por 24h. Foi feito o tratamento com 1000 nM da DisBa-01 em normóxia e hipóxia por 24h. Em seguida as células foram fixadas com 4% paraformaldeído em PBS 1X por 20 minutos, permeabilizada com 0,3% Triton X-100 por 10 minutos. Os aldeídos livres formados no processo de fixação foram bloqueados com 100 mM glicina por 5 minutos e os sítios inespecíficos foram então bloqueados com BSA 2% em PBS 1X por 1 hora à temperatura ambiente. Foi utilizado o anticorpo primário VE-Cadherin

(Thermo Fisher Scientific, 36–1900, 1:70) *overnight* e o secundário Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, A11008, 4 µg/mL) por 1 hora em temperatura ambiente. Foi feita a montagem das lamínulas sobre lâminas com a solução de montagem Prolong™ *Diamond Antifade Mount* (Invitrogen) e selagem com esmalte cosmético. As lâminas foram observadas o microscópio confocal Axio Observer (Zeiss, Jena, Germany), Sistema LSM 780, software Fluoview FV10 (Olympus), 2.10 v. no Hospital de Amor – Barretos, SP, nas mesmas intensidades e ganho do laser para as diferentes fluorescências num aumento de 63X e zoom de 2X. As imagens foram analisadas no programa FijiJ ImageJ – *Skeleton, branch length*. A intensidade de cada campo foi dividida pelos núcleos.

5.14 Estatística

Foi utilizado o programa SigmaPlot 7 para análise da estatística. Para dados paramétricos foi utilizado a análise de variância ANOVA-*two-way* ou ANOVA-*one-way post hoc* Teste Tukey, considerando 5% como critério de significância ($p \leq 0,05$). Para os dados não-paramétricos foi utilizado análise Kruskal-Wallis One-Way Analysis of Variance on Ranks *post hoc* de Teste Dunn considerando-se o mesmo nível crítico de 5%. Os gráficos foram feitos no programa GraphPad.

6. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho foi dividido da seguinte maneira:

1) Os resultados da cultura 2D e/ou monocamada da célula MDA-MB-231 e a HUVEC no bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ em ambiente hipóxico, publicado na revista *International Journal Molecular Science*, está descrito no capítulo I: O efeito do bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ em células de tumor de mama em célula endotelial em ambiente hipóxico.

2) Os experimentos de interação, Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR – *Surface Plasmon Resonance*) e colocalização, entre a DisBa-01 e as proteínas de matriz está descrito no capítulo II. DisBa-01 anchors endothelial cells to fibronectin and vitronectin through $\alpha_v\beta_3$ integrin. Neste manuscrito possui alguns experimentos feitos durante o meu mestrado.

Os itens do manuscrito que foram feitos durante o meu doutorado são:

3.2 Interaction between the DisBa-01 with FN and VN by SPR

3.4 *DisBa-01* colocalizes with $\alpha_v\beta_3$ integrin in FN coated surface

3.5 *DisBa-01*- $\alpha_v\beta_3$ integrin complex colocalizes with FN/VN coating in HUVEC

3.6 *DisBa-01*- $\alpha_v\beta_3$ integrin complex colocalizes with FN/VN in HUVEC

3.7 Profile of integrins in HUVECs in the presence and absence of *DisBa-01*

3) Os resultados da cultura 3D da célula MDA-MB-231 e a HUVEC no bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ com o tratamento da *DisBa-01* em normóxia e hipóxia está descrito no capítulo III: Consequências do bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ no compacto agregado da célula MDA-MB-231 e no esferóide da HUVEC com o tratamento da *DisBa-01* em normóxia e hipóxia.

4) Os experimentos de interação entre a *DisBa-01* com o VEGFR2 por SPR e análise da EndoMT estão descritos no capítulo IV: A sutil interação entre a *DisBa-01* com o VEGFR2 e análise da EndoMT em HUVECs com o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$.

CAPÍTULO I: O efeito do bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ em células de tumor de mama em célula endotelial em ambiente hipóxico



International Journal of
Molecular Sciences



Article

The Effects of $\alpha_v\beta_3$ Integrin Blockage in Breast Tumor and Endothelial Cells under Hypoxia In Vitro

Bruna C. Casali ^{1,2}, Larissa T. Gozzer ¹, Matheus P. Baptista ¹, Wanessa F. Altei ^{3,4} and Heloisa S. Selistre-de-Araújo ^{1,*}

¹ Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos 13560-905, SP, Brazil; brunaccasali@yahoo.com.br (B.C.C.); larissagozzer@estudante.ufscar.br (L.T.G.); matheuspbaptista12@gmail.com (M.P.B.)

² Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos 13560-905, SP, Brazil

³ Departamento de Radioterapia, Hospital do Câncer de Barretos, Barretos 14784-400, SP, Brazil; wanessa.altei@hospitaldeamor.com.br

⁴ Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular, Hospital do Câncer de Barretos, Barretos 14784-400, SP, Brazil

* Correspondence: hсараујо@ufscar.br; Tel.: +55-16-99634-5500

Abstract: Breast cancer is characterized by a hypoxic microenvironment inside the tumor mass, contributing to cell metastatic behavior. Hypoxia induces the expression of hypoxia-inducible factor (HIF-1 α), a transcription factor for genes involved in angiogenesis and metastatic behavior, including the vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinases (MMPs), and integrins. Integrin receptors play a key role in cell adhesion and migration, being considered targets for metastasis prevention. We investigated the migratory behavior of hypoxia-cultured triple-negative breast cancer cells (TNBC) and endothelial cells (HUVEC) upon $\alpha_v\beta_3$ integrin blocking with DisBa-01, an RGD disintegrin with high affinity to this integrin. Boyden chamber, HUVEC transmigration, and wound healing assays in the presence of DisBa-01 were performed in hypoxic conditions. DisBa-01

Citation: Casali, B.C.; Gozzer, L.T.; Baptista, M.P.; Altei, W.F.;

Selistre-de-Araújo, H.S. The Effects of $\alpha_v\beta_3$ Integrin Blockage in Breast Tumor and Endothelial Cells under Hypoxia In Vitro. *Int. J. Mol. Sci.*

2022, 23, 1745.

<https://doi.org/10.3390/ijms23031745> Academic Editor: Hidayat Hussain

Accepted: 25 January 2022

Published: 3 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

produced similar effects in the two oxygen conditions in the Boyden chamber and transmigration assays. In the wound healing assay, hypoxia abolished DisBa-01's inhibitory effect on cell motility and decreased the MMP-9 activity of conditioned media. These results indicate that $\alpha v\beta 3$ integrin function in cell motility depends on the assay and oxygen levels, and higher

inhibitor concentrations may be necessary to achieve the same inhibitory effect as in normoxia. These versatile responses add more complexity to the role of the $\alpha v\beta 3$ integrin during tumor progression.

Keywords: breast tumor; hypoxia; $\alpha v\beta 3$ integrin blocking; cell migration; disintegrin; DisBa-01

1

. Introduction

Despite the advances in diagnostics and treatment, breast cancer remains with high incidence and mortality, with 18.1 million new cases and 9.9 million deaths worldwide, being the main leading oncological cause of female deaths in 2020 [1]. Triple-negative breast cancer (TNBC) is characterized by the absence of estrogen receptors (ER), progesterone receptors (PR), and human epidermal growth factor type 2 receptor (HER2), resulting in a poor prognosis, since these cell types do not respond to conventional receptor-targeted therapies [2]. Moreover, TNBC cells are highly metastatic, using the tumor microenvironment and the extracellular matrix (ECM) as support for proliferation and spreading [3,4]. During tumor development, cancer cells induce collagen deposition in the surrounding microenvironment, increasing ECM stiffness, known as tumor fibrosis [5,6]. Solid tumors such as breast cancer are usually characterized by fibrosis and uncontrolled cell proliferation combined with abnormal vascularization, resulting in hypoxic areas in the middle of the tumor [7,8]. Patients with poorly oxygenated solid tumors have a higher risk of developing metastasis [9,10].

In hypoxic conditions, the hypoxia-induced factor (HIF-1) is the central molecule that triggers cellular responses. HIF-1 is composed of two subunits, HIF-1 α and HIF-1 β , whose interaction activates hypoxic response elements (HRE), promoting the expression of pro angiogenic genes, primarily the vascular endothelial growth factor (VEGF) [11]. This response will stimulate tumor vascularization in order to provide better tumor nutrition;

however, these new vessels are not well formed and present higher permeability compared to normal vessels. Defective tumor angiogenesis will also contribute to tumor cell transmigration across the endothelial barrier and to the spread of malignant cells through the body [9,10]. HIF-1 α also induces matrix metalloproteinase (MMP) expression, such as gelatinases MMP-2 and MMP-9, which degrade the ECM, assisting in tumor cell migration [12,13]. Other HIF-1 α targets of increased expression are some membrane receptors such as the integrins [14,15].

Integrins are transmembrane dimeric receptors formed by a noncovalent interaction between alpha and beta ($\alpha\beta$) subunits, being responsible for cell adhesion to the ECM [16]. Integrins are involved in a number of physiological processes, including chondrogenesis, axonal regeneration, and ECM remodeling [17–19]. Integrins have a critical role in cell migration, which is one of the main events in the metastatic cascade. To reach secondary sites, tumor cells must detach from the primary tumor, degrade and invade the ECM, and transmigrate through the endothelial barrier to finally intravasate to the blood or lymphatic vessels [20,21]. During these steps, integrins mediate adhesion foci assembly and disassembly, supporting cell movement and providing directionality [22]. Furthermore, the recycling of integrins is required for successful cell migration [21]. Integrin activation upon ECM binding triggers intracellular signaling cascades of several kinases, including focal adhesion kinase (FAK), mitogen-activated kinase (MAPK), and extracellular signal-regulated kinase (ERK) [23]. In endothelial cells, integrin activation is linked to the activation of the VEGF/VEGFR2 axis; therefore, integrins are intimately related to the control of angiogenesis [24,25]. This integrin–ECM crosstalk is a central player in the migratory ability of cells; therefore, integrins have become interesting targets for metastasis prevention or treatment [26,27].

Integrin expression changes according to the type of tumor and the disease stage [28]. Integrins $\alpha5\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha\nu\beta5$, $\alpha5\beta3$, and, in particular, $\alpha\nu\beta3$ have essential roles in tumorigenesis and angiogenesis [29]. The $\alpha\nu\beta3$ integrin

recognizes RGD ligands present in the ECM proteins such as fibronectin and vitronectin, promoting cell motility and metastasis [30]. Recently, the $\alpha v\beta 3$ integrin was demonstrated to be translationally activated in hypoxia, resulting in activation of the epithelial–mesenchymal transition program and cell migration, and increased metastatic behavior [31]. An integrin inhibitor, cilengitide, inhibited the $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$ integrins and tumor progression in a number of pre-clinical assays that stimulated its testing in clinical trials [32]. Cilengitide, however, has not increased glioblastoma patient survival [33,34] or decreased the number of metastases [35]. Cilengitide's failure may be related to the dose, tumor type, or the lack of deeper knowledge on the integrins' molecular mechanisms of action [36]. Therefore, a better understanding of integrin function and searches for new integrin antagonists are of evident interest [37].

Disintegrins are natural integrin inhibitors used as tools in the design of new anti cancer therapies [38]. Disintegrins such as bothrasperin from *Bothrops asper* and veridistatin from *Crotalus viridis* inhibit the adhesion of melanoma cells and migration of murine breast cancer cells, respectively [39]. Most disintegrins exhibit an adhesive motif, such as RGD, ECD, or KTS, that binds to specific integrins. Accurhagin-c, an ECD disintegrin from *Agkistrodon acutus*, is a $\alpha V/\alpha 5$ antagonist that prevents the migration and invasion of endothelial cells and decreases B16F10 proliferation [40].

DisBa-01 is an RGD recombinant disintegrin from *Bothrops alternatus* with high affinity to the $\alpha v\beta 3$ integrin ($K_D = 1.6 \times 10^{-7} M$), with in vivo anti-angiogenic, anti metastatic, and anti-thrombotic properties [41]. DisBa-01 is around 100-times more specific for the $\alpha v\beta 3$ integrin than $\alpha 5\beta 1$ ($K_D = 7.62 \times 10^{-5} M$) [42]. DisBa-01 inhibits cell

Int. J. Mol. Sci. **2022**, *23*, 1745 3 of 17

proliferation and migration in a number of cell lines in vitro [41–44], and there is crosstalk between the $\alpha v\beta 3$ integrin and the vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR2) in HUVECs [45,46]. DisBa-01 impaired the directionality of oral squamous cell carcinoma migration [42]. All in vitro studies with DisBa-01 were performed in normoxia, a very different condition from the one found inside solid tumors.

Here, we investigate the migration of breast cancer MDA-MB-231 cells and endothelial cells in hypoxia using some in vitro models, focusing on the effect of $\alpha v\beta 3$ integrin blocking upon treatment with DisBa-01. Due to the essential role of the $\alpha v\beta 3$ integrin in metastatic spreading, our results indicate the distinct behavior of the tumor and endothelial cells upon $\alpha v\beta 3$ integrin blockade, depending on the migration assay and oxygen condition. These results might be of relevance when considering testing integrin inhibitors in clinical trials for solid tumors.

2. Results

2.1. Blocking $\alpha v \beta 3$ Integrin Inhibits MDA-MB-231 Cell Migration in Normoxia and Hypoxia

To study the role of the $\alpha v \beta 3$ integrin in cell motility under hypoxia, we used three different migration models (transwell, endothelial transmigration, and wound healing) in hypoxia and in the presence or not of a specific antagonist, DisBa-01. The same assays were performed in parallel under normoxic conditions for comparison. MDA-MB-231 cell migration in the Boyden chamber was inhibited by DisBa-01 in a concentration-dependent way and in a similar way in the two oxygen conditions (Figure 1A–C). The IC₅₀ values were 13.43 nM and 19.87 nM ($p = 0.97$) in normoxia and in hypoxia, respectively, indicating a small difference between the two conditions. Representative images of the analyzed membranes are depicted in Figure 1B.

We further addressed the role of the $\alpha v \beta 3$ integrin in a transendothelial migration assay. MDA-MB-231 cells in suspension were treated with DisBa-01 and placed inside the insert to transmigrate through a HUVEC monolayer (Figure 1D–F). DisBa-01 inhibited transmigration in normoxia and hypoxia, with IC₅₀ values of 5.24 nM and 5.22 nM, respectively, revealing no significant differences between the two oxygen conditions. Interestingly, 10 nM DisBa-01 induced maximal inhibition in the two oxygen conditions in the transmigration assay, different from the effect observed in the Boyden chamber migration assay, where the same inhibitory effect was observed only for the 1000 nM DisBa-01 concentration. Representative images of CFSE-labeled MDA-MB-231 cells after transmigration are shown in Figure 1E.

The wound healing assay was performed at three time points. After 12 h, there was no difference between normoxia and hypoxia (Figure 1G–H); however, after 24 and 48 h, there were significant differences between the two conditions (Figure 1I–L). Hypoxia impaired wound closure in DisBa-01-treated and non-treated cells. Moreover, DisBa-01's

inhibitory effect was detected in normoxia for all tested concentrations.

Conversely, DisBa-01 was effective only at its highest concentration (1000 nM) in hypoxia (Figure 1I–

K) after 24 and 48 h. Collectively, these results indicate that the $\alpha v \beta 3$ integrin has a critical role for MDA-MD-231 cell migration since its inhibition significantly impairs chemotaxis. On the other hand, in the case of the wound healing assay, motility without a chemoattractant is strongly affected by lower oxygen conditions.

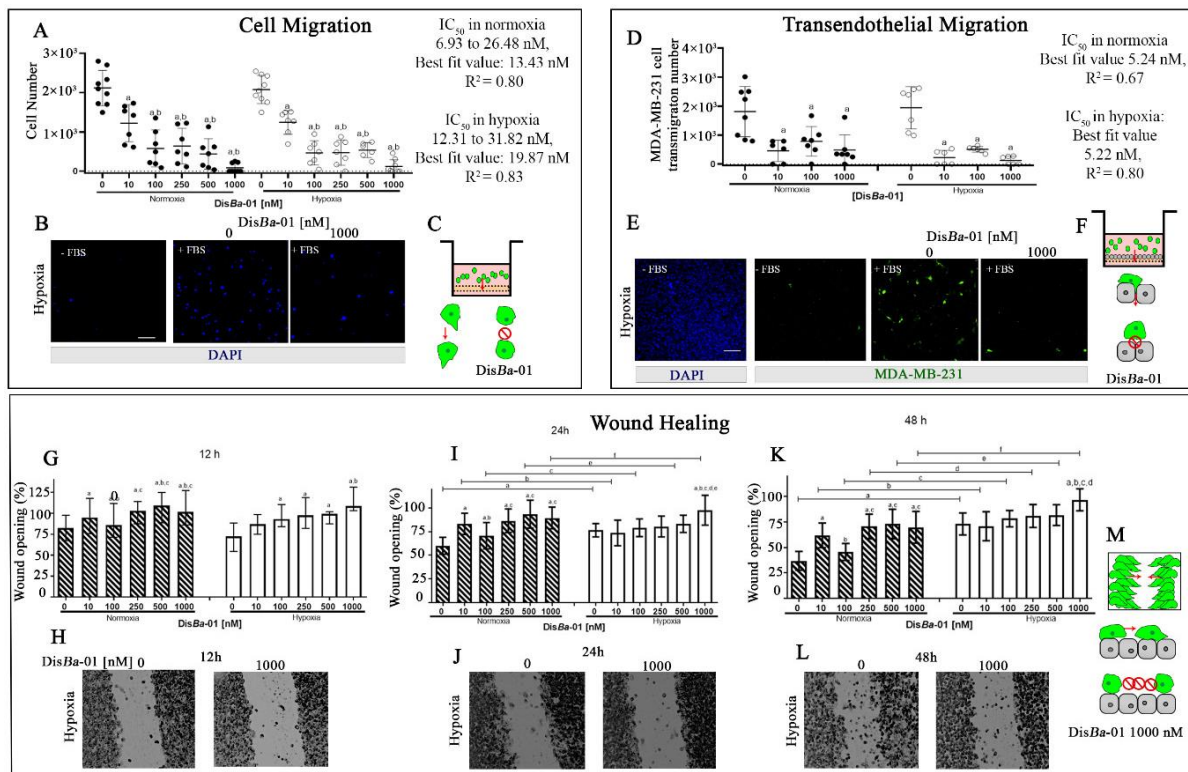


Figure 1. Inhibition of MDA-MB-231 cell migration by $\alpha v\beta 3$ integrin blocking in normoxia and hypoxia. (A–C) Boyden chamber assay, MDA-MB-231 cells treated with indicated DisBa-01 concentrations. (A) Migrated cells in absence or presence of DisBa-01 in normoxia and hypoxia. Values were compared to negative control (without chemoattractant). (B) Representative images of migrating cells treated or not with DisBa-01 in hypoxia. (D–F) Transendothelial migration of CFSE labeled MDA-MB-231 cells in a HUVEC layer. (D) Transmigrated cells in absence and presence of DisBa-01 in normoxia and hypoxia. Values were compared to negative control (without chemoattractant). (A) and (D) graphics represent mean \pm SD. (E) Representative images of transmigrating cells treated or not with DisBa-01 in hypoxia. (C) and (F) Graphical summary of the two assays. (G–M) Wound healing assay of MDA-MB-231 cells in the presence of DisBa-01 in normoxia and hypoxia for 12 (G–H), 24 (I–J), and 48 (K–L) hours. (M) Graphical summary of the wound healing assay in the presence of DisBa-01. (G), (I), and (K) graphics represent median \pm SD. Letters over bars mean: *a*, significantly different from control; *b*, significantly different from 10 nM; *c*, from 100 nM; *d*, from 250 nM, and *e*, from 500 nM (mean \pm SD). All experiments were performed in triplicate from three independent assays ($n = 3$, $p < 0.05$). Scale bar: 100 μ m. Red arrows in graphical summary represent the direction of migration.

2.2. MMP Levels in the Conditioned Media from Cell Migration Assays

We next tested MMP activity in the conditioned media (CM) from the independent assays by gelatin zymography (Figure 2). Our hypothesis was based on our

previous studies in normoxia, where we demonstrated that DisBa-01 decreased MMP-2 activity, which would contribute to the inhibition of cell migration [42,43]. The pattern of MMP activity in the CM from the transwell assay was similar in normoxia and hypoxia (Figure 2A), with slight differences between the two conditions. The main bands detected and quantified were pro-MMP-9 and pro-MMP-2. The levels of pro-MMP-9 were higher in the control samples in normoxia compared to hypoxia (Figure 2B). A tendency for pro-MMP

9 to decrease upon DisBa-01 treatment was observed only for the 100 nM concentration in hypoxia (Figure 2B). DisBa-01's effect was more pronounced on the pro-MMP-2 levels, mostly in hypoxia and only for the highest concentrations (Figure 2C).

We did not observe any significant differences in MMP pattern in the CM from the transmigration assays in normoxia or hypoxia. DisBa-01 did not affect MMP activity in either condition (Figure 2E–H). Conversely, hypoxia decreased the levels of pro-MMP-9

Int. J. Mol. Sci. **2022**, *23*, 1745 5 of 17

in the CM from the wound healing assay (Figure 2I,J), without changes in pro-MMP-2 bands (Figure 2K,L). Only the highest DisBa-01 concentrations (500 and 1000 nM) increased the pro-MMP-9 levels in both normoxia and hypoxia conditions (Figure 2J). There were no differences in CM total protein concentration from all the assays in the two oxygen conditions (Figure 2D,H,M). We conclude that hypoxia negatively affected MMP

9 expression in the wound healing assay, independently of $\alpha\beta 3$ integrin inhibition.

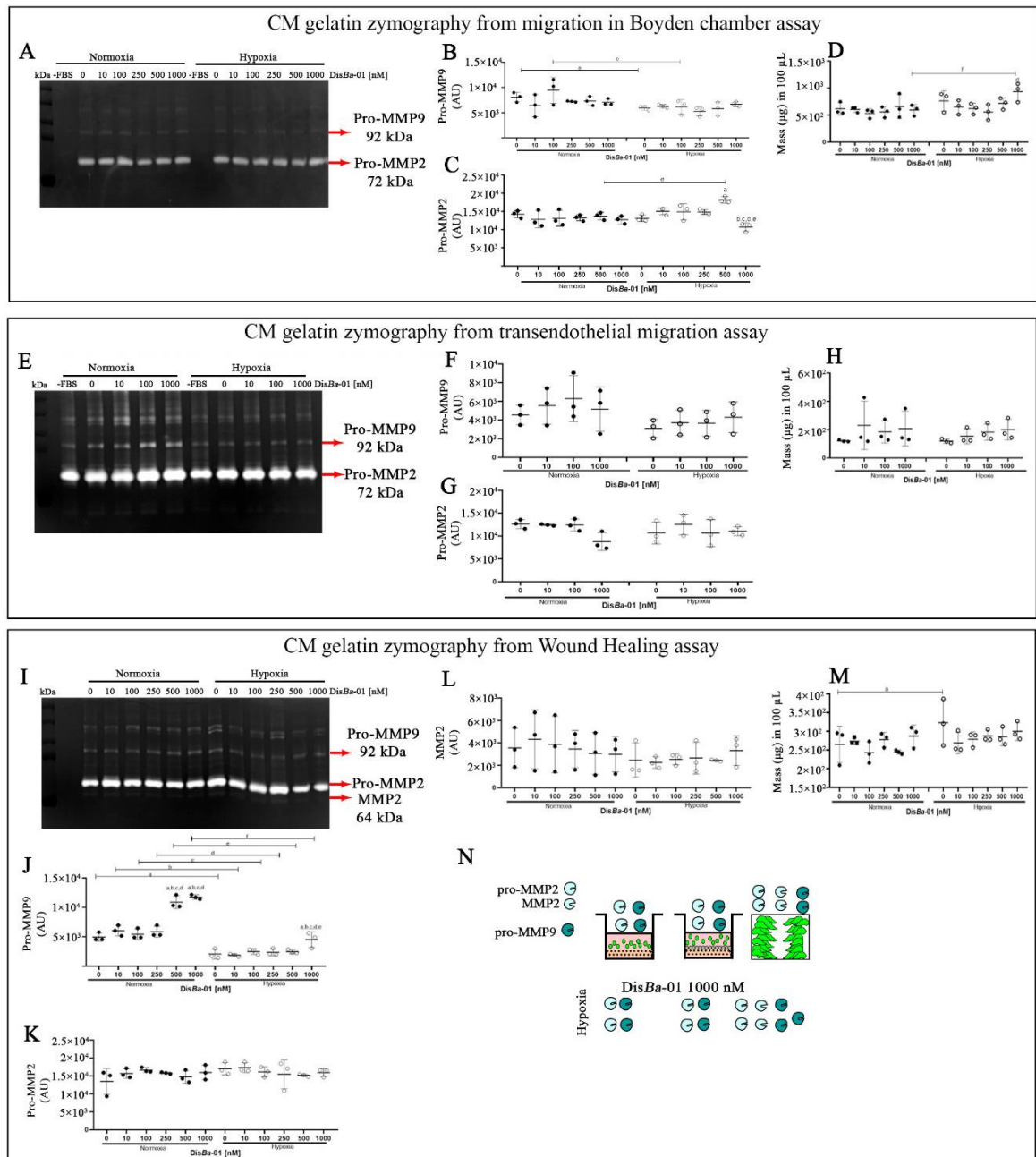


Figure 2. MMP-2 and MMP-9 levels in the conditioned media (CM) from MDA-MB-231 cell migration assays. (A,E,I) Representative zymographs of CM from transwell, transmigration, and wound healing assays; (B,F,J) Quantification of pro-MMP-9 levels by densitometry; (C,G,K,L) Quantification of pro-MMP-2 and active MMP-2 levels by densitometry; (D,H,M) CM total protein concentration. (N) Graphical summary of the assays. Experiments were performed in triplicate with three independent assays ($n = 3$). The results (mean \pm SD) were compared using two-way ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$). Graphic letters *a*, *b*, *c*, *d*, and *e* represent comparisons among 0, 10, 100, 250, 500, and 1000 nM of DisBa-01, respectively.

2.3. DisBa-01's Effects on HUVEC Tube Formation Ability in Normoxia and Hypoxia

One of the initial steps of tumor angiogenesis is tube development. To address the effect of hypoxia in this process, HUVECs were grown on GFR Matrigel for the development of a capillary-like network. Parameters such as total length, master junctions, number of nodes, and score (area \times total branching \times number of meshes) were measured in normoxia and hypoxia in the presence or absence of DisBa-01. The total length of tubes, the number of nodes, and master junctions were reduced by $\alpha v\beta 3$ integrin blocking by DisBa-01 only at its highest concentration (1000 nM), both in normoxia and hypoxia (Figure 3A–E). Representative images of this assay are shown in Figure 3A. We conclude that hypoxia does not significantly inhibit tube formation and higher

concentrations of integrin inhibitors are necessary to inhibit this process.

We also tested the ability of DisBa-01 to inhibit HUVEC migration in the Boyden chamber and wound healing assays. DisBa-01 had no effect in normoxia, and it inhibited HUVEC migration in the Boyden chamber assay only at high concentrations in hypoxia (Figure 3G,H). Results of the wound healing assay were distinct after 9 and 24 h. After 9 h, DisBa-01 was effective in inhibiting the closure only at its highest concentration, both in normoxia and hypoxia (Figure 3J,K). After 24 h, however, all DisBa-01 concentrations inhibited wound healing in the two conditions, with the exception of the 10 nM concentration in hypoxia (Figure 3L,M). We conclude that hypoxia inhibits wound closure and high concentrations of DisBa-01 are needed for integrin inhibition in this condition.

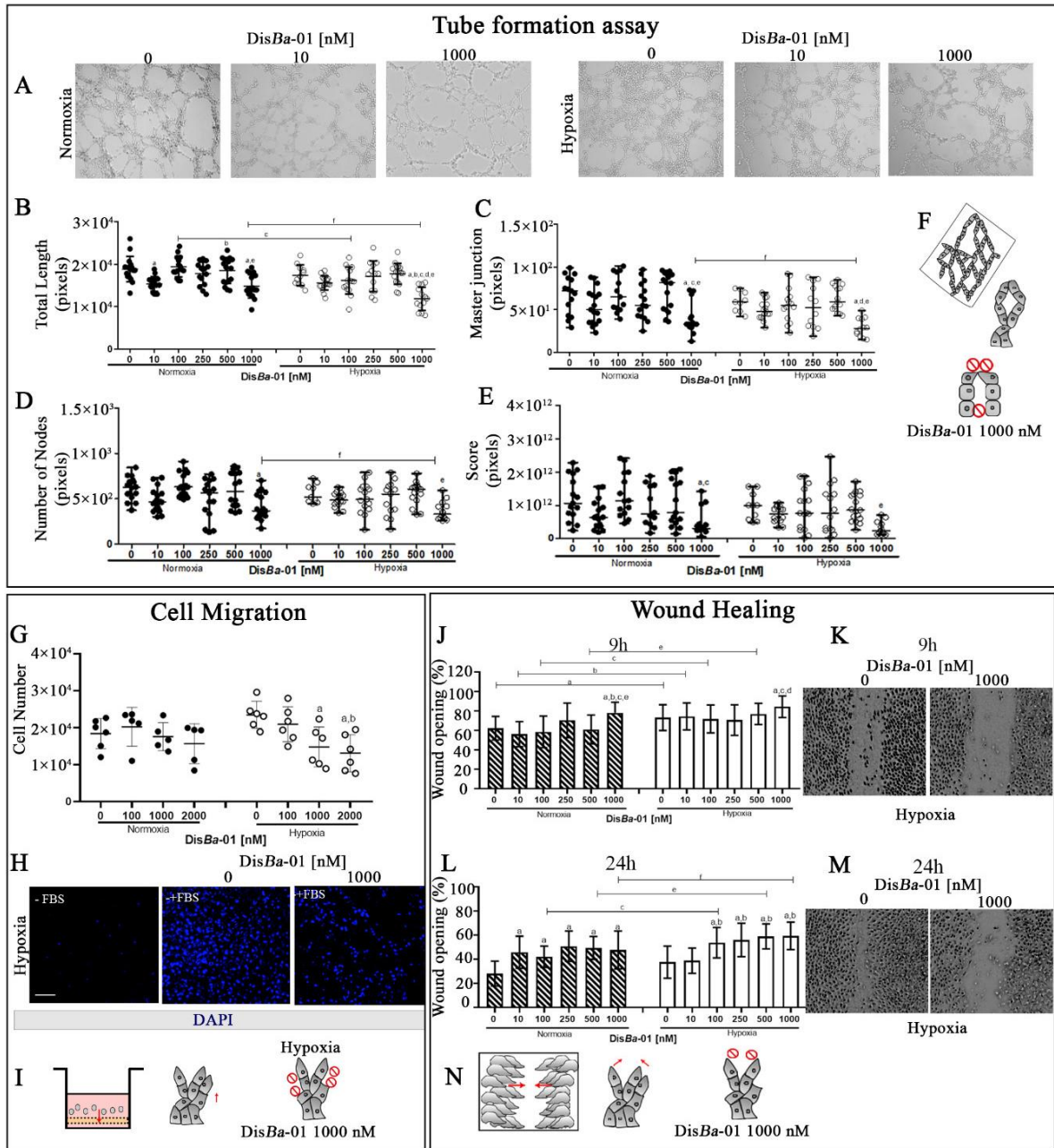


Figure 3. Inhibition of tube formation and cell migration of DisBa-01-treated HUVECs in normoxia and hypoxia. (A–F) Tube formation assay. Representative images of HUVECs in the indicated conditions (A), total length (B), master junctions (C), number of nodes (D), and score (E) by pixel quantification of DisBa-01-treated HUVECs in the two oxygen conditions. Experiments were performed in triplicate of three independent assays ($n = 3$, $p < 0.05$). (F) Graphical summary of the assay. (G–H), Boyden chamber migration assay of DisBa-01-treated HUVECs. Values were compared to negative control (without chemoattractant) (G). Representative images of migrating cells treated or not with DisBa-01 in hypoxia (H). Scale bar: 100 μ m. (J–N) HUVEC wound healing assay. Percentage (mean \pm SD) of wound opening in indicated concentrations of DisBa-01 in normoxia and hypoxia after 9 and 24 h (J,L). Representative images of scratches in hypoxia (K,M). (I,N) Graphical summary of the

two migration assays. Graphic letters *a, b, c, d, e,* and *f* represent comparisons between 0, 10, 100, 250, 500, and 1000 nM of DisBa-01, respectively. All experiments were performed in triplicate from three independent assays ($n = 3, p < 0.05$). Red arrows in graphical summary represent the direction of migration.

2.4. Levels of $\beta 3$ Integrin Subunit Change Depending on the Cell Type and Oxygenation

Int. J. Mol. Sci. **2022**, *23*, 17458 of 17

Since cells can change their integrin content according to the signals from the milieu, we next analyzed whether hypoxia could affect the expression of the $\beta 3$ integrin subunit by flow cytometry. MDA-MB-231 cells presented around 15% of $\beta 3$ integrin subunit in normoxia, but this value increased by almost 10% (24%) in hypoxia (Figure 4 A–C). DisBa 01 treatment had no effect in both oxygen conditions (Figure 4 D,E). Controls were similar in normoxia and hypoxia (Figure 4F).

Results in HUVECs showed the opposite. The expression of the $\beta 3$ subunit integrin in HUVECs was approximately 55% in normoxia and 40% hypoxia, a decrease of approximately 15% in the lower oxygen condition (Figure G–I). Similarly to MDA-MB 231 cells, DisBa-01 treatment did not alter $\beta 3$ integrin content in HUVECs in normoxia or in hypoxia (Figure 4 J,K). Controls were similar in normoxia and hypoxia (Figure 4L).

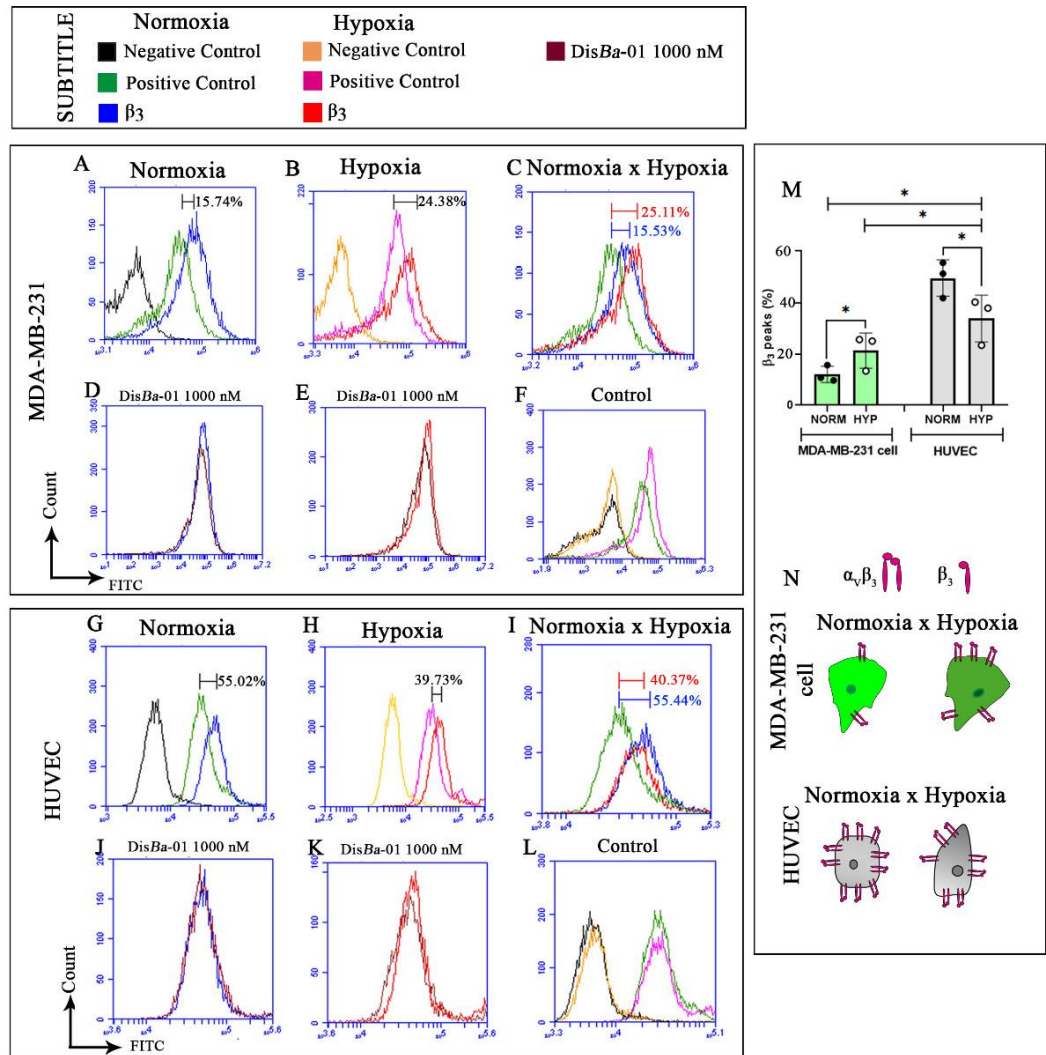


Figure 4. Profile of β_3 integrin subunit in MDA-MB-231 and HUVECs in normoxia and hypoxia. (A–F) Detection of β_3 integrin subunit in MDA-MB-231 cells in normoxia (A), in hypoxia (B), and merge of (A) and (B) (C). Detection of β_3 integrin in MDA-MB-231 cells after DisBa-01 treatment in normoxia (D), and in hypoxia (E), and negative and positive controls in normoxia and hypoxia (F). (G–L) Detection of β_3 integrin subunit in HUVECs in normoxia (G), in hypoxia (H), and merge of (G) and (H); (I) HUVEC β_3 integrin content after DisBa-01 treatment in normoxia (J) and in hypoxia (K), and negative and positive controls in normoxia and hypoxia (L). (M) Data quantification and statistics for MDA-MB-231 cells and HUVECs under normoxia and hypoxia. * means statistical differences between MDA-MB-231 cells (green bars) and HUVEC (gray bars) in normoxia and hypoxia. (N) Graphical summary of β_3 integrin subunit profile in MDA-MB-231 cells and HUVECs

with or without DisBa-01 in normoxia and hypoxia. Experiments were performed in

triplicate from three independent assays ($n = 3, p < 0.05$).

2.5. Blockage of $\alpha\beta3$ Integrin by DisBa-01 Disturbs MDA-MB-231 Cells and HUVEC Morphology in Normoxia and Hypoxia without Inducing Apoptosis

Cell migration can be impaired due to loose cell adhesions by the disassembly of the actin cytoskeleton and interruption of binding between extracellular matrix proteins and integrins. We therefore investigated possible changes in the morphology of MDA-MB-231 cells and HUVECs after DisBa-01 treatment in hypoxia compared with normoxia. As expected, DisBa-01 decreased the cell total area/nucleus ratio at the tested concentrations similarly at the two oxygen conditions for the MDA-MB-231 cells (Figure 5A,B). Similar results were found for HUVECs with only a minor difference observed. The highest DisBa

01 concentration (2 μ M) was more effective in normoxia than hypoxia (Figure 5D,E).

The possibility of either hypoxia or DisBa-01 treatment to induce apoptosis was investigated by flow cytometry. Since wound healing assays were performed in the presence of mitomycin-c to avoid measuring cell proliferation instead of migration, we tested cells for apoptosis in the presence or not of mitomycin-c. DisBa-01 did not induce apoptosis, as demonstrated by the PE-annexin V assays, either in normoxia or in hypoxia; however, hypoxia induced apoptosis in approximately 10% of cells, but only in the presence of mitomycin-c (Supplementary Figures S1–S4). Therefore, we conclude that the inhibition of the $\alpha\beta3$ integrin by DisBa-01 does not induce apoptosis in hypoxia or normoxia. Despite the loose adhesions, cells remain attached and do not die.

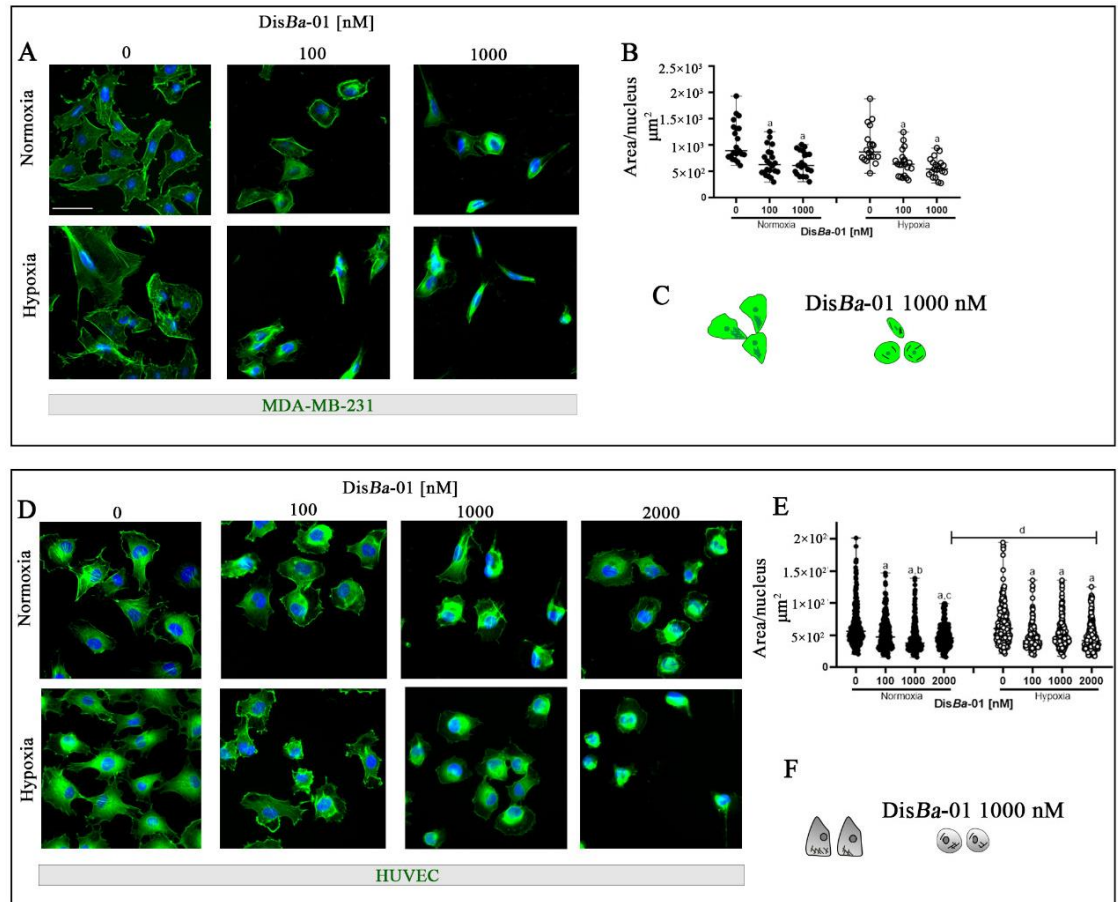


Figure 5. The morphology of MDA-MB-231 cells and HUVEC changes upon $\alpha\beta_3$ integrin blocking by DisBa-01 in normoxia and hypoxia. (A) MDA-MB-231 cells treated with DisBa-01 for 4 h. (B) Graphic represents the sum of cell total area (μm^2) divided by the number of nuclei in the two conditions. Analysis was performed using ImageJ after cell staining in 100 cells per well. (D)

Int. J. Mol. Sci. **2022**, *23*, 1745 10 of 17

HUVECs were treated with DisBa-01 for 4 h. (E) Graphic represents cell area (μm^2) divided by the number of nuclei in normoxia and hypoxia. Experiments were performed in duplicate or triplicate with three independent assays ($n = 3$). Results for MDA-MB-231 cells were compared using two way ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$). HUVEC results were compared using the Kruskal–Wallis one-way analysis of variance on ranks post hoc Dunn test and all data ($p < 0.05$). Results are shown as median with range of variation. Graphic letters *a*, *b*, *c*, and *d* represent comparisons among 0, 100, 1000, and 2000 nM of DisBa-01, respectively. Scale bar = 50 μm . Graphical summary of MDA-MB-231 (C) and HUVEC (F) morphology with and without DisBa-01 in normoxia and hypoxia.

3. Discussion

Cell migration is critical for tumor angiogenesis and metastasis, and the $\alpha v\beta 3$ integrin plays a critical role in these two processes. Antagonists of the $\alpha v\beta 3$ integrin strongly inhibit cell migration and cell directionality as well [22,42]. However, it is not well understood why the good results obtained in pre-clinical assays are not reproduced in vivo when translated into clinical trials [36]. One of the reasons for the low effectiveness of such inhibitors could be the lack of deeper knowledge about the microenvironment within a solid tumor, often under hypoxic conditions. In the present paper, we have studied the role of the $\alpha v\beta 3$ integrin in a hypoxic milieu using a strong inhibitor of this receptor in a set of migration assays. We have previously determined that DisBa-01 has approximately 100-times more affinity to the $\alpha v\beta 3$ than $\alpha 5\beta 1$ integrin, another RGD-binding receptor involved in cell migration [42]. This specificity allowed us to conclude that the observed cellular effects upon DisBa-01 treatment are mostly due to the $\alpha v\beta 3$ integrin, at least at the lowest concentrations.

DisBa-01 was previously demonstrated to inhibit HUVEC and 4T1BM cell migration in normoxia [45,47] but it was never tested in hypoxia as we show here. Intriguingly, inhibition results varied depending on the assay. In the Boyden chamber assay, DisBa-01 inhibited the motility of MDA-MB-231 cells regardless of the oxygen level. The same effect was observed in the endothelial transmigration assay; however, in hypoxia, the maximum inhibitory effect was achieved with the lowest DisBa-01 concentration. This result may be a consequence of the increased levels of tumor cell $\beta 3$ integrin in hypoxia and suggests a key role for endothelial $\alpha v\beta 3$ integrin in the interaction with tumor cells during extravasation. Despite the high DisBa-01 specificity to the $\alpha v\beta 3$ integrin, other surface proteins may be overexpressed in HUVECs under hypoxia and could additionally interfere in tumor cell extravasation. More studies are needed to confirm this possibility.

The most significant effect of hypoxia was observed in the wound healing assay after 24 and 48 h of incubation, where only the highest DisBa-01 concentration was effective. One of the main differences between the wound healing and the transwell assays relies on the lack of a chemoattractant that provides directionality for the migrating cell. Since the $\alpha v\beta 3$ integrin is critically involved in movement direction [42], this assay proved to be more sensitive to DisBa-01, highlighting the effect on hypoxia.

A previous work demonstrated that the $\beta 3$ integrin is translationally activated under hypoxia [31]. In this paper, the authors explored both the transcriptome and the translome of MDA-MB-231 cells in hypoxia compared to normoxia and identified the $\beta 3$ integrin as a critical target. Moreover, silencing of ITGB3 gene expression inhibited cell migration in a wound healing assay in hypoxia but not in normoxia [31]. Collectively, these results and ours suggest that hypoxia activates the $\beta 3$ integrin and therefore higher concentrations of the inhibitor may be necessary to produce an effective inhibitory response.

Breast tumor cells release MMPs to the extracellular matrix. These proteolytic enzymes, including the gelatinases, have a key role in degrading ECM

proteins, assisting in migration and invasion in the tumor microenvironment [48,49]. Furthermore, integrins are directly associated with MMP control [50]. Tumor cells usually express high levels of MMP-9, which supports cell motility during invasion [51]. The $\alpha v\beta 3$ integrin activates MMP-2- and MMP-9-dependent pathways in breast cancer metastasis [52]. MMP-2 is a target for HIF-1 α that intermediates endothelial migration and angiogenesis in hypoxia

Int. J. Mol. Sci. **2022**, *23*, 1745 11 of 17

[53]. On the other hand, decreased MMP-9 levels in breast tumors are associated with tissue fibrosis, a common finding in this disease [54]. In this work, we demonstrated the distinct profiles of MMP-2 and MMP-9 from TNBC migration assays. Our results show that a hypoxic environment impairs MMP-9 upregulation in tumor cells. Decreased MMP

9 activity was previously correlated with hypoxia and matrix stiffness in breast cancer patients [54]. Expression of constitutively activated $\alpha v\beta 3$ integrin in metastatic variants of TNBC MDA-MB-435 strongly increased migration due to elevated levels of MMP-9 [55]. Furthermore, the role of some members of the ADAM (A Disintegrin And Metalloproteases) protein family in TNBC cell migration has been previously demonstrated. For instance, ADAM8 has a key role in TNBC transendothelial migration by promoting the upregulation of MMP-9 [49]. These results are in agreement with ours and confirm the controlling role of integrins on MMPs.

Previous studies have shown the inhibitory effects on cell migration of other snake venom-derived proteins, including RGD disintegrins such as r-majostin from *Crotalus scutulaus scutulatus* and r-viridistatin from *Crotalus viridis viridis* [56], tzabcanin from *C. simus* [57], dabmaurin-1 from *Daboia mauritanica* [58], and disintegrins from *Crotalus totonacus* [59] and *Bothrops alternatus* [60] for different types of tumor cells. These studies, however, were performed in normoxia only. Non-RGD disintegrins from *Crotalus durissus colineatus* inhibited MDA-MB-231 migration in a wound healing assay after 24 h in normoxia [61].

Angiogenesis is the process of producing new vessels to supply oxygen and nutrients to meet increasing tissue demands, such as that which occurs in solid tumors. Angiogenesis can be mimicked by the tube formation assay on Matrigel, where endothelial cells form tube-like structures. The composition and variability of the Matrigel affect cell growth and differentiation [62,63]. We have previously demonstrated that DisBa-01 inhibits tube formation in Matrigel in normoxia, even in the presence of exogenous VEGF [45]. Here, we show that DisBa-01's effects are attenuated in the tube formation assay under hypoxia. Only the highest DisBa-01 concentration inhibits tube formation in hypoxia in GFR Matrigel. These results indicate that high concentrations of integrin inhibitors are required to halt angiogenesis in solid tumors.

DisBa-01 treatment strongly affects cell morphology, with decreased stress fibers, suggesting a possible loss of adherence upon $\alpha v\beta 3$ integrin inhibition. In this case, cells would go into apoptosis; however, cytometry analysis showed that DisBa-01 does not induce apoptosis. We have previously reported that DisBa-01 activates the autophagy program instead of apoptosis, at least during the first 24 h, and cells remain attached, probably by using other adhesion receptors [47]. This study was carried out with 4T1BM cells, a murine TNBC cell line highly metastatic to the brain, but we believe that the same may happen with the cells used in the present work. The key role of the $\alpha v\beta 3$ integrin in cell migration is not to support strong adhesions but to provide directionality for a moving cell, as previously reported by us and others [22,42]. DisBa-01's effects on MDA-MB-231 cells and HUVEC morphology are independent of the oxygenation condition.

In conclusion, our results indicate that inhibiting the $\alpha v\beta 3$ integrin in hypoxic conditions may demand higher inhibitor concentrations. Our data may be useful considering other types of cancer besides breast tumors, because integrins have been described as having a key role in different tumor types, including colorectal carcinoma [64]. Of course, we have to consider that each cell type may respond differently to hypoxia or to integrin inhibitors. The results described here can be helpful in the design of new pre-clinical and clinical studies targeting the integrins.

4. Materials and Methods

4.1. DisBa-01 Expression and Purification

The expression and purification of DisBa-01 was performed as described by [41]. Briefly, *E. coli* BL21(DE3) was transformed with plasmid pet28(a)DisBa-01. Protein

Int. J. Mol. Sci. **2022**, *23*, 1745 12 of 17

expression was induced for 3 h, followed by lysis and purification in three steps: affinity chromatography (HIS-Select® HF Nickel Affinity Gel, Sigma-Aldrich, Code: P6611), size exclusion chromatography (Superdex 75 10/300 GL, GE Healthcare, Code: 17-5174-01, Uppsala, Sweden), and anion exchange chromatography (Mono-Q 5/50 GL, GE Healthcare, Code: 17-516601, Uppsala, Sweden). Total protein was determined by colorimetric detection of bicinchoninic acid assay (Pierce BCA Protein Assay, Thermo Scientific, Catalog Number: 23225, U.S.).

4.2. Cells and Cell Culture

Triple-negative breast tumor cells (MDA-MB-231) and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs, 8 to 20 passages) were from ATCC. Both cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Vitrocell, Vitrocell, Campinas, SP, Brazil) supplemented with 10% (*v/v*) fetal bovine serum (FBS, Vitrocell, Campinas, SP, Brazil), penicillin (100 IU/mL), streptomycin (100 mg/mL), and L-glutamine (2 mM), in a humidified

environment with 5% CO₂ at 37 °C. Subcultures were performed using trypsin and trypan blue stain solution (0.4%, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) on a TC20 automated cell counter (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Cells in experiments were maintained in 20% O₂ and 5% CO₂ (normoxia) and an incubator chamber (H35 Hypoxystation, Don Whitley Sci., Bingley, UK) with a gas mixture containing 1% O₂ and 5% CO₂ (hypoxia), both at 37 °C.

4.3. Transwell Boyden Chamber Assay

Chemotaxis assays were performed to assess MDA-MB-231 cell migration upon $\alpha v \beta 3$ integrin blocking by DisBa-01. For transwell assays, a 24-well insert, ThinCert™ translucent PET membrane, 8.0 μ m pore (Greiner Bio-one®, Frickenhausen, Germany) were used. MDA-MB-231 cells (1×10^5) in medium without serum were treated with DisBa-01 for 30 min at room temperature and inserted into the upper part of the Boyden chamber. The lower chamber contained medium plus 10% SFB. The system was incubated for 16 h (MDA-MB-231 cells) or 24 h (HUVEC) at 37 °C in normoxic and hypoxic conditions. Filters were fixed with 3.7% paraformaldehyde and the remaining cells on the upper surface were removed using a cotton swab. The nuclei of migrating cells were stained with 0.7 ng/ μ L DAPI solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Catalog Number: 62248). Membranes were assembled on a microscope slide for automated cell counting in an ImageXpress Micro microscope (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) under 10x magnification with the Meta-X-press software, and quantified using the Multi Wavelength Cell Scoring.

4.4. Transendothelial Cell Migration Assay

To evaluate MDA-MB-231 cell migration through a layer of endothelial cells, 8×10^4 HUVECs were subcultured onto 8.0 μ m pore 12-well inserts (Greiner Bio-one®, Frickenhausen, Germany Catalog number: C34554) with serum in the upper and lower chambers for 24 h in 5% CO₂ at 37 °C. Then, MDA-MB-231 cells (0.6×10^5) were labeled with Cell Trace™ CFSE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Catalog number: C34554). MDA-MB-231 cells were treated with DisBa-01 in serum-free medium for 30 min at room temperature, and then allowed to transmigrate through the endothelial layer for 16 h at 37 °C in a normoxic and hypoxic environment. The lower chamber contained medium plus 10% SFB. Filters were fixed with 3.7% paraformaldehyde and the remaining cells on the upper surface were removed using a cotton swab. The nuclei of migrated cells were stained with 0.7 ng/ μ L DAPI solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Catalog Number: 62248). Membranes were assembled on a microscope slide for automated cell counting in an ImageXpress Micro microscope (Molecular Devices San Jose, CA, USA) under 10x magnification with the Meta-X-press software, quantified using the Multi Wavelength Cell Scoring.

4.5. Wound Healing Assay

MDA-MB-231 cells (1×10^5) and HUVEC (1×10^5) were seeded in a 24-well culture plate for 48 and 24 h, respectively. The confluent monolayer was wounded using a sterile 200 μ L pipette tip to generate a cell-free area. Then, cells were treated with 10 μ g/mL mitomycin-c (Sigma, St. Louis, MO, USA, Code:M4287) for 4 h, followed by washing 2x with PBS. Cells were treated with DisBa-01 in medium containing 10% FBS and incubated in normoxia and hypoxia for 24 h. The images were captured using an inverted microscope (Axio Vert.A1 Zeiss – AxioCam MRc Zeiss camera, Oberkochen, Germany) using the AxionVision Rel.4.8 software of a Vert.A1 microscope (Zeiss) in a 10x magnifying glass in three areas each well. Cell migration was analyzed through ImageJ v.1.52a [65] software considering the percentage of wound opening border: $= \Delta h \times 100/T_0$, where Δh is the area of the wound measured at different times and T_0 is the average of the area of the wound measured immediately after scratching.

4.6. Zymography Assay

The conditioned media from the transwell Boyden chamber, transendothelial, and wound healing assays with MDA-MB-231 cells were analyzed for their MMP content by gelatin zymography. Culture medium was collected, protein quantified, and incubated in sample buffer under non-reducing conditions. Samples were resolved on a 10% polyacrylamide gel containing 0.1% gelatin at 4 °C. Gels were washed two times with 2.5% Triton X-100 and incubated at 37 °C for 18 h in 50 mM Tris buffer, pH 8.0, 5 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃, and 10 mM ZnCl₂. After staining with Coomassie Blue R-250 and destaining with acetic acid:methanol:water (1:4:5), the clear bands were quantified by densitometry using ImageJ software. MMP-2 and MMP-9 were represented in arbitrary units (AU).

4.7. Tube Formation Assay

The tube formation assay on Matrigel (Growth Factor Reduced – GFR, Product Number: 354230, Corning, NY, USA) was performed to evaluate the ability of DisBa-01 in inhibiting angiogenesis after 10 h incubation under hypoxic conditions. Firstly, HUVECs (3×10^4 cells) were treated for 30 min with DisBa-01 and plated on 1:1 Matrigel dilution (35 μ L/well) in 0.5% SFB medium in a 96-well plate. Images were photographed using the AxionVision Rel.4.8 software of a Vert.A1 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) in a 10x magnifying glass and analyzed using the Angiogenesis Analyzer plugin for ImageJ software v.1.52a.

4.8. Analysis of Cell Morphology

MDA-MB-231 cells (1×10^4 cells/well) and HUVECs (3×10^4 cells/well) were plated in a 96-well black microplate (Corning 3603) overnight at 37 °C, 5% CO₂. Cells were exposed to DisBa-01 for 4 h in DMEM supplemented with 10% FBS in

normoxia and hypoxia. Afterwards, cells were fixed in 3.7% paraformaldehyde for 10 min, permeabilized using 0.3% Triton X-100 for 5 min, and stained with Alexa Fluor® 488 Phalloidin (F-actin dye, Thermo Fisher Scientific, Catalog Number: 12379) in DAPI-PBS (1:40) for 30 min. Fluorescent samples were observed using ImageXpress (Molecular Devices) equipment with 40x magnification. Morphology was analyzed in ImageJ software v.1.52a [65] and quantified using Threshold for MDA-MB-231 and ImageXpressMicro microscope (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) under 40x magnification with the Meta-X-press software, and quantified using the Multi Wavelength Cell Scoring for HUVEC.

4.9. Profile of $\beta 3$ Integrin Subunit in Normoxia and Hypoxia by Flow Cytometry

Cells were incubated without and with DisBa-01 for 24 h in normoxia and hypoxia. Then, cells are harvested and centrifuged at 400 g in 4 °C. MDA-MB-231 cells and HUVECs were incubated with monoclonal integrin beta 3 antibody (ab11992, Abcam, Cambridge, UK), and washed and incubated with Alexa Fluor 488-labeled secondary

Int. J. Mol. Sci. **2022**, *23*, 1745 14 of 17

antibody (ab11008, ThermoFisher, Waltham, MA, USA), followed by analysis in a flow cytometer (BD Accuri™ C6, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

4.10. Apoptosis Assay

The possible apoptotic activity of DisBa-01 on MDA-MB-231 cells and HUVECs under hypoxia was analyzed by flow cytometry with the PE-Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, Catalog Number: 559763). Cells (1×10^5) were seeded in 24-well plates with DMEM and incubated overnight. A cell-free area was created using a sterile 200 μ L pipette tip following treatment with or without mitomycin-c for 4 h for MDA-MB-231 and 2 h for HUVECs at 37 °C and 5% CO₂. Then, cells were treated with DisBa-01 in medium containing 10% FBS and incubated in a normoxic and hypoxic environment for 24 h. After this period, control cells were harvested, heated at 100 °C for 5 min, and chilled at 4 °C immediately. Cells were incubated with PE-Annexin V and 7-aminoactinomycin D (7ADD) for 15 min in the dark at 4 °C, followed by the addition of binding buffer. Cells treated with DisBa-01 (0, 100, and 1000 nM) were incubated with PE-Annexin V and 7ADD, harvested, centrifuged at 400 g, and suspended in binding buffer. Analyses were performed in a flow cytometer (BD Accuri™ C6, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

4.11. Statistical Analysis

Data were obtained in at least triplicate in three independent series of experiments and analyses were performed using the statistical SigmaPlot7 program. For

parametric data, we performed two-way ANOVA or one-way ANOVA and post hoc Tukey test, and non-parametric data were subjected to the Kruskal–Wallis one-way analysis of variance on ranks post hoc Dunn test. Values of $p < 0.05$ were considered statically significant. Graphics were generated in the GraphPad program showing mean \pm SD for normal distribution of population and median \pm SD for non-normal distribution of population.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23031745/s1, Supplementary. Figure S1. Apoptotic assay of MDA-MB-231 cells treated with mitomycin-C and DisBa-01. (A) Cells treated with DisBa-01 in normoxia. (B) Controls with or without dyes (7AAD and PE-Annexin V) in normoxia. (C) Cells treated with DisBa-01 in hypoxia. (D) Controls with or without dyes (7AAD and PE-Annexin V) in hypoxia. Supplementary Figure S2 Apoptotic assay of MDA-MB-231 cells treated with DisBa-01 without mitomycin-C. (A) Cells treated with DisBa-01 in normoxia. (B) Controls with or without dyes (7AAD and PE-Annexin V) in normoxia. (C) Cells treated with DisBa-01 in hypoxia. (D) Controls with or without dyes (7AAD and PE-Annexin V) in hypoxia. Supplementary Figure S3. Apoptotic assay of HUVECs treated with mitomycin-C and DisBa-01. (A) Cells treated with DisBa-01 in normoxia. (B) Controls with or without dyes (7AAD and PE-Annexin V) in normoxia. (C) Cells treated with DisBa-01 in hypoxia. (D) Controls with or without dyes (7AAD and PE-Annexin V) in hypoxia. Supplementary Figure S4. Apoptotic assay of HUVECs treated with DisBa-01 without mitomycin-C. (A) Cells treated with DisBa-01 in normoxia. (B) Controls with or without dyes (7AAD and PE-Annexin V) in normoxia. (C) Cells treated with DisBa-01 in hypoxia. (D) Controls with or without dyes (7AAD and PE-Annexin V) in hypoxia.

Author Contributions: Conceptualization, B.C.C., H.S.S.-d.-A. and W.F.A.; investigation, B.C.C., L.T.G. and M.P.B.; formal analysis, B.C.C., W.F.A. and H.S.S.-d.-A.; supervision, project administration, and funding acquisition, H.S.S.-d.-A.; writing, review and editing, B.C.C., M.P.B., W.F.A. and H.S.S.-d.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Finance Code 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 429235/2018-6 and 306225/2017-4), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2013/00798-2 and 2019/11437-7), Brazil. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Int. J. Mol. Sci. **2022**, *23*, 1745 15 of 17

Data Availability Statement: The authors declare that the data generated in the current study are available within the article or from the corresponding author upon reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249.
2. Moss, J.L.; Tatalovich, Z.; Zhu, L.; Morgan, C.; Cronin, K.A. Triple-negative breast cancer incidence in the United States: Ecological correlations with area-level sociodemographics, healthcare, and health behaviors. *Breast Cancer* **2021**, *28*, 82–91. <https://doi.org/10.1007/s12282-020-01132-w>.
3. Lu, P.; Weaver, V.M.; Werb, Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* **2012**, *196*, 395–406. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102147>.
4. Joyce, J.A.; Pollard, J.W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Cancer* **2008**, *9*, 239–252. <https://doi.org/10.1038/nrc2618>.
5. Gilkes, D.M.; Semenza, G.L.; Wirtz, D. Hypoxia and the extracellular matrix: Drivers of tumour metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 430–439.
6. Paszek, M.J.; Zahir, N.; Johnson, K.R.; Lakins, J.N.; Rozenberg, G.I.; Gefen, A.; Reinhart-King, C.A.; Margulies, S.S.; Dembo, M.; Boettiger, D.; et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* **2005**, *8*, 241–254. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.08.010>.
7. Gilkes, D.M.; Semenza, G.L. Role of hypoxia-inducible factors in breast cancer metastasis. *Future Oncol.* **2013**, *9*, 1623–1636. <https://doi.org/10.2217/fon.13.92>.
8. De Heer, E.C.; Jalving, M.; Harris, A.L. HIFs, angiogenesis, and metabolism: Elusive enemies in breast cancer. *J. Clin. Investig.* **2020**, *130*, 5074–5087. <https://doi.org/10.1172/jci137552>.
9. Vaupel, P. Prognostic Potential of the Pretherapeutic Tumor Oxygenation Status. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2009**, *645*, 241–246. https://doi.org/10.1007/978-0-387-85998-9_36.
10. Osinsky, S.; Zavelevich, M.; Vaupel, P. Tumor hypoxia and malignant progression. *Exp. Oncol.* **2009**, *31*, 80–86.
11. Gilkes, D.M.; Bajpai, S.; Chaturvedi, P.; Wirtz, D.; Semenza, G.L. Hypoxia-inducible Factor 1 (HIF-1) Promotes Extracellular Matrix Remodeling under Hypoxic Conditions by Inducing P4HA1, P4HA2, and PLOD2 Expression in Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 10819–10829. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.442939>.
12. Muñoz-Nájjar, U.M.; Neurath, K.M.; Vumbaca, F.; Claffey, K.P. Hypoxia stimulates breast carcinoma cell invasion through MT1- MMP and MMP-2 activation. *Oncogene* **2005**, *25*, 2379–2392. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209273>.
13. Choi, J.Y.; Jang, Y.S.; Min, S.Y.; Song, J.Y. Overexpression of MMP-9 and HIF-1 α in Breast Cancer Cells under Hypoxic Conditions. *J. Breast Cancer* **2011**, *14*, 88–95. <https://doi.org/10.4048/jbc.2011.14.2.88>.
14. Brooks, D.L.P.; Schwab, L.P.; Krutilina, R.; Parke, D.N.; Sethuraman, A.; Hoogewijs, D.; Schörg, A.; Gotwald, L.; Fan, M.; Wenger, R.H.; et al. ITGA6 is directly regulated by hypoxia-inducible factors and enriches for cancer stem cell activity and invasion in metastatic breast cancer models. *Mol. Cancer* **2016**, *15*, 26. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0510-x>.
15. Ju, J.A.; Godet, I.; Ye, I.C.; Byun, J.; Jayatilaka, H.; Lee, S.J.; Xiang, L.; Samanta, D.; Lee, M.H.; Wu, P.-H.; et al. Hypoxia Selectively Enhances Integrin $\alpha 5\beta 1$ Receptor Expression in Breast Cancer to Promote Metastasis. *Mol. Cancer Res.* **2017**, *15*, 723–734. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-16-0338>.
16. Hynes, R.O. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* **2002**, *110*, 673–687. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00971-6).
17. Shakibaei, M.; Csaki, C.; Mobasheri, A. Diverse roles of integrin receptors in articular cartilage. *Sperm Acrosome Biog. Funct. Dur. Fertil.* **2008**, *197*, 1–60. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-78771-6>.
18. Nieuwenhuis, B.; Haenzi, B.; Andrews, M.R.; Verhaagen, J.; Fawcett, J.W. Integrins promote axonal regeneration after injury of the nervous system. *Biol. Rev.* **2018**, *93*, 1339–1362. <https://doi.org/10.1111/brv.12398>.
19. Su, C.-Y.; Li, J.-Q.; Zhang, L.-L.; Wang, H.; Wang, F.-H.; Tao, Y.-W.; Wang, Y.-Q.; Guo, Q.-R.; Li, J.-J.; Liu, Y.; et al. The Biological Functions and Clinical Applications of Integrins in Cancers. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 579068. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.579068>.
20. Conway, J.R.; Jacquemet, G. Cell matrix adhesion in cell migration. *Essays Biochem.* **2019**, *63*, 535–551. <https://doi.org/10.1042/ebc20190012>.
21. Moreno-Layseca, P.; Icha, J.; Hamidi, H.; Ivaska, J. Integrin trafficking in cells and tissues. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 122–132. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0223-z>.

22. Missirlis, D.; Haraszti, T.; Scheele, C.V.C.; Wiegand, T.; Diaz, C.; Neubauer, S.; Rechenmacher, F.; Kessler, H.; Spatz, J.P. Substrate engagement of integrins $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ is necessary, but not sufficient, for high directional persistence in migration on fibronectin. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23258. <https://doi.org/10.1038/srep23258>.
23. Provenzano, P.; Keely, P.J. The role of focal adhesion kinase in tumor initiation and progression. *Cell Adhes. Migr.* **2009**, *3*, 347–350. <https://doi.org/10.4161/cam.3.4.9458>.
24. Comoglio, P.M.; Boccaccio, C.; Trusolino, L. Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: Breaking the rules. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15*, 565–571. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(03\)00096-6](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(03)00096-6).
- Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1745 16 of 17
25. Poulos, F.; Petrich, B.G. Integrin-dependent regulation of the endothelial barrier. *Tissue Barriers* **2019**, *7*, 1685844. <https://doi.org/10.1080/21688370.2019.1685844>.
26. Guan, X. Cancer metastases: Challenges and opportunities. *Acta Pharm. Sin. B* **2015**, *5*, 402–418. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.005>.
27. Rocha, L.A.; Learmonth, D.A.; Sousa, R.A.; Salgado, A.J. $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ integrin-specific ligands: From tumor angiogenesis inhibitors to vascularization promoters in regenerative medicine? *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 208–227. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.11.004>.
28. Yousefi, H.; Vatanmakanian, M.; Mahdiannasser, M.; Mashouri, L.; Alahari, N.V.; Monjezi, M.R.; Ilbeigi, S.; Alahari, S.K. Understanding the role of integrins in breast cancer invasion, metastasis, angiogenesis, and drug resistance. *Oncogene* **2021**, *40*, 1043–1063. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01588-2>.
29. Mezu-Ndubuisi, O.J.; Maheshwari, A. The role of integrins in inflammation and angiogenesis. *Pediatr. Res.* **2021**, *89*, 1619–1626. <https://doi.org/10.1038/s41390-020-01177-9>.
30. Zhu, C.; Kong, Z.; Wang, B.; Cheng, W.; Wu, A.; Meng, X. ITGB3/CD61: A hub modulator and target in the tumor microenvironment. *Am. J. Transl. Res.* **2019**, *11*, 7195–7208.
31. Sesé, M.; Fuentes, P.; Esteve-Codina, A.; Béjar, E.; McGrail, K.; Thomas, G.; Aasen, T.; Cajal, S.R.Y. Hypoxia-mediated translational activation of ITGB3 in breast cancer cells enhances TGF- β signaling and malignant features in vitro and in vivo. *Oncotarget* **2017**, *8*, 114856–114876. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23145>.
32. Mas-Moruno, C.; Fraioli, R.; Rechenmacher, F.; Neubauer, S.; Kapp, T.G.; Kessler, H. $\alpha v\beta 3$ - or $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Selective Peptidomimetics for Surface Coating. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 7048–7067. <https://doi.org/10.1002/anie.201509782>.
33. Lombardi, G.; Pambuku, A.; Bellu, L.; Farina, M.; Della Puppa, A.; Denaro, L.; Zagonel, V. Effectiveness of antiangiogenic drugs in glioblastoma patients: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Crit. Rev. Oncol.* **2017**, *111*, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.01.018>.
34. Cheuk, I.W.; Siu, M.T.; Ho, J.C.; Chen, J.; Shin, V.Y.; Kwong, A. ITGAV targeting as a therapeutic approach for treatment of metastatic breast cancer. *Am. J. Cancer Res.* **2020**, *10*, 211–223.
35. Haddad, T.; Qin, R.; Lupu, R.; Satele, D.; Eadens, M.; Goetz, M.P.; Erlichman, C.; Molina, J. A phase I study of cilengitide and paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2017**, *79*, 1221–1227. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3322-9>.
36. Chinot, O.L. Cilengitide in glioblastoma: When did it fail? *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, 1044–1045. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(14\)70403-6](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(14)70403-6).
37. Alday-Parejo, B.; Stupp, R.; Rüegg, C. Are Integrins Still Practicable Targets for Anti-Cancer Therapy? *Cancers* **2019**, *11*, 978. <https://doi.org/10.3390/cancers11070978>.
38. Macêdo, J.; Fox, J.; Castro, M.S. Disintegrins from Snake Venoms and their Applications in Cancer Research and Therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2015**, *16*, 532–548. <https://doi.org/10.2174/1389203716666150515125002>.
39. Angulo, Y.; Castro, A.; Lomonte, B.; Rucavado, A.; Fernández, J.; Calvete, J.J.; Gutiérrez, J.M. Isolation and characterization of four medium-size disintegrins from the venoms of Central American viperid snakes of the genera *Atropoides*, *Bothrops*, *Cerrophidion* and *Crotalus*. *Biochimie* **2014**, *107*, 376–384. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.10.010>.

40. Shih, C.-H.; Chiang, T.-B.; Wang, W.-J. Inhibition of integrins $\alpha v/\alpha 5$ -dependent functions in melanoma cells by an ECD disintegrin acurhagin-C. *Matrix Biol.* **2013**, *32*, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.01.001>.
41. Ramos, O.H.P.; Kauskot, A.; Cominetti, M.R.; Bechyne, I.; Pontes, C.L.S.; Chareyre, F.; Manent, J.; Vassy, R.; Giovannini, M.; Legrand, C.; et al. A novel $\alpha v\beta 3$ -blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **2007**, *25*, 53–64. <https://doi.org/10.1007/s10585-007-9101-y>.
42. Montenegro, C.F.; Casali, B.C.; Lino, R.L.B.; Pachane, B.C.; dos Santos, P.; Horwitz, A.R.; Selistre-De-Araujo, H.S.; Lamers, M. Inhibition of $\alpha v\beta 3$ integrin induces loss of cell directionality of oral squamous carcinoma cells (OSCC). *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0176226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176226>.
43. Kauskot, A.; Cominetti, M.R.; Ramos, O.H.P.; Bechyne, I.; Renard, J.-M.; Hoylaerts, M.F.; Crepin, M.; Legrand, C.; Selistre-De Araujo, H.S.; Bonnefoy, A. Hemostatic effects of recombinant DisBa-01, a disintegrin from *Bothrops alternatus*. *Front. Biosci.* **2008**, *13*, 6604–6616. <https://doi.org/10.2741/3176>.
44. Cassini-Vieira, P.; Deconte, S.R.; Tomiosso, T.C.; Campos, P.P.; Montenegro, C.D.F.; Selistre-De-Araújo, H.S.; Barcelos, L.S.; Andrade, S.P.; Araújo, F.D.A. DisBa-01 inhibits angiogenesis, inflammation and fibrogenesis of sponge-induced-fibrovascular tissue in mice. *Toxicon* **2014**, *92*, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.007>.
45. Danilucci, T.M.; Santos, P.K.; Pachane, B.C.; Pisani, G.F.D.; Lino, R.L.B.; Casali, B.C.; Altei, W.F.; Selistre-De-Araujo, H.S. Recombinant RGD-disintegrin DisBa-01 blocks integrin $\alpha v\beta 3$ and impairs VEGF signaling in endothelial cells. *Cell Commun. Signal.* **2019**, *17*, 27. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0339-1>.
46. Montenegro, C.F.; Salla-Pontes, C.L.; Ribeiro, J.U.; Machado, A.Z.; Ramos, R.F.; Figueiredo, C.C.; Morandi, V.; Selistre-De Araujo, H.S. Blocking $\alpha v\beta 3$ integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. *Biochimie* **2012**, *94*, 1812–1820. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.04.020>.
47. Lino, R.L.B.; dos Santos, P.; Pisani, G.F.D.; Altei, W.; Cominetti, M.R.; Selistre-De-Araújo, H.S. Alphavbeta3 integrin blocking inhibits apoptosis and induces autophagy in murine breast tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2019**, *1866*, 118536. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.118536>.
- Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1745 17 of 17
48. Radisky, E.S.; Raeeszadeh-Sarmazdeh, M.; Radisky, D.C. Therapeutic Potential of Matrix Metalloproteinase Inhibition in Breast Cancer. *J. Cell. Biochem.* **2017**, *118*, 3531–3548. <https://doi.org/10.1002/jcb.26185>.
49. Jena, M.K.; Janjanam, J. Role of extracellular matrix in breast cancer development: A brief update. *F1000Research* **2018**, *7*, 274. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14133.2>.
50. Conrad, C.; Götte, M.; Schlomann, U.; Roessler, M.; Pagenstecher, A.; Anderson, P.; Preston, J.; Pruessmeyer, J.; Ludwig, A.; Li, R.; et al. ADAM8 expression in breast cancer derived brain metastases: Functional implications on MMP-9 expression and transendothelial migration in breast cancer cells. *Int. J. Cancer* **2018**, *142*, 779–791. <https://doi.org/10.1002/ijc.31090>.
51. Eiro, N.; Gonzalez, L.; Fraile, M.; Cid, S.; Schneider, J.; Vizoso, F. Breast Cancer Tumor Stroma: Cellular Components, Phenotypic Heterogeneity, Intercellular Communication, Prognostic Implications and Therapeutic Opportunities. *Cancers* **2019**, *11*, 664. <https://doi.org/10.3390/cancers11050664>.
52. Niland, S.; Eble, J.A. Hold on or Cut? Integrin- and MMP-Mediated Cell–Matrix Interactions in the Tumor Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *22*, 238. <https://doi.org/10.3390/ijms22010238>.
53. Krock, B.L.; Skuli, N.; Simon, M.C. Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil. *Genes Cancer* **2011**, *2*, 1117–1133. <https://doi.org/10.1177/1947601911423654>.
54. Kuo, Y.-L.; Jou, I.-M.; Jeng, S.-F.; Chu, C.-H.; Huang, J.-S.; Hsu, T.-I.; Chang, L.-R.; Huang, P.-W.; Chen, J.-A.; Chou, T.-M. Hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and fibrosis for the development of breast capsular contracture. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 10629. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46439-7>.
55. Rolli, M.; Fransvea, E.; Pilch, J.; Saven, A.; Felding-Habermann, B. Activated integrin $\alpha 3$ cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9482–9487. <https://doi.org/10.1073/pnas.1633689100>.

56. Lucena, S.E.; Jia, Y.; Soto, J.G.; Parral, J.; Cantu, E.; Brannon, J.; Lardner, K.; Ramos, C.J.; Seoane, A.I.; Sánchez, E.E. Anti-invasive and anti-adhesive activities of a recombinant disintegrin, r-viridistatin 2, derived from the Prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *Toxicon* **2012**, *60*, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.011>.
57. Saviola, A.J.; Burns, P.D.; Mukherjee, A.K.; Mackessy, S.P. The disintegrin tzabcanin inhibits adhesion and migration in melanoma and lung cancer cells. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *88*, 457–464. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.008>.
58. Chalier, F.; Mugnier, L.; Tarbe, M.; Aboudou, S.; Villard, C.; Kovacic, H.; Gignes, D.; Mansuelle, P.; De Pomyers, H.; Luis, J.; et al. Isolation of an Anti-tumour Disintegrin: Dabmaurin-1, a Peptide Lebein-1-like, from *Daboia mauritanica* Venom. *Toxins* **2020**, *12*, 102. <https://doi.org/10.3390/toxins12020102>.
59. Mercado, E.R.; Castro, E.N.; Valle, M.B.; Rucavado-Romero, A.; Rodríguez, A.O.; Zuñiga, F.Z.; Cano, A.A.; Ocañas, L.G. Disintegrins extracted from totonacan rattlesnake (*Crotalus totonacus*) venom and their anti-adhesive and anti-migration effects on MDA-MB-231 and HMEC-1 cells. *Toxicol. Vitro.* **2020**, *65*, 104809. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104809>.
60. Selistre-De-Araujo, H.S.; Pontes, C.L.S.; Montenegro, C.F.; Martin, A.C.B.M. Snake Venom Disintegrins and Cell Migration. *Toxins* **2010**, *2*, 2606–2621. <https://doi.org/10.3390/toxins2112606>.
61. De Oliveira, I.S.; Manzini, R.V.; Ferreira, I.; Cardoso, I.A.; Bordon, K.D.C.F.; Machado, A.R.T.; Antunes, L.M.G.; Rosa, J.C.; Arantes, E.C. Cell migration inhibition activity of a non-RGD disintegrin from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **2018**, *24*, 28. <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0167-6>.
62. The influence of Matrigel or growth factor reduced Matrigel on human intervertebral disc cell growth and proliferation. *Histol Histopathol.* **1999**, *14*, 359–368.
63. Patel, R.; Alahmad, A.J. Growth-factor reduced Matrigel source influences stem cell derived brain microvascular endothelial cell barrier properties. *Fluids Barriers CNS* **2016**, *13*, 6. <https://doi.org/10.1186/s12987-016-0030-5>.
64. Buhrmann, C.; Shayan, P.; Goel, A.; Shakibaei, M. Resveratrol Regulates Colorectal Cancer Cell Invasion by Modulation of Focal Adhesion Molecules. *Nutrients* **2017**, *9*, 1073. <https://doi.org/10.3390/nu9101073>.

CAPÍTULO II - Manuscrito em redação: DisBa-01 anchors endothelial cells to fibronectin and vitronectin through $\alpha_v\beta_3$ integrin

DisBa-01 anchors endothelial cells to fibronectin and vitronectin through $\alpha_v\beta_3$ integrin

Casali, B.C.; Moritz, M.N.O.; Altei, W.F.; Pachane, B.C.; Stotzer, U.S; Danilluci, T.M; Selistre-de-Araújo, H.S.

Corresponding author: Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo
Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, km 235-SP-310 – São Carlos – SP, CEP 13565-905, email: hsaraujo@ufscar.br

Abstract

The tumor microenvironment is represented mainly by the presence of tumor cells, endothelial cells, stromal and immune cells, and the deposition of matrix proteins. Fibronectin (FN) and vitronectin (VN) are extracellular matrix compounds that bind to integrins present on the surface of cells. Interaction between integrins and extracellular matrix (ECM) proteins, such as the binding between $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins with VN and FN, respectively, is an important key to understanding tumor responses, mainly through cell migration, angiogenesis and metastasis. Inhibitors of the $\alpha_v\beta_3$ integrin were demonstrated to be important targets in efforts to develop new drugs with anti-angiogenic or anti-metastatic properties. DisBa-01, a recombinant RGD-disintegrin from *Bothrops alternatus*, binds with high affinity to $\alpha_v\beta_3$ integrin inhibiting cellular events related to tumor progression, such as migration and endothelial cell proliferation in both *in-vitro* and *in-vivo* models. DisBa-01 does not induce apoptosis, but it inhibits tube formation on matrigel coating in normoxia and hypoxia. Furthermore, OSCC on FN coated loses migration directionality in DisBa-01 presence. Our hypothesis is that DisBa-01 could act as an anchor between ECM proteins and the cell, so it would avoid motility and anoikis as well. The aim of this study was to investigate a possible direct interaction of DisBa-01 with FN/VN. We demonstrated that DisBa-01 binds to FN (k_d : 4.61×10^{-6} M) and VN (k_d : 4.8×10^{-6} M) with similar affinities. This disintegrin colocalizes with $\alpha_v\beta_3$ integrin and FN/VN coating in HUVEC. Overall, we inferred that DisBa-01 anchors HUVEC with compounds of the matrix, FN and VN during migration.

Keys-word: fibronectin, vitronectin, integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$, DisBa-01, dissociation constant, plasmon resonance

1. INTRODUCTION

Tumor cell behavior is influenced by its surrounding microenvironment, including adjacent cells (e.g, immune, endothelial, mesenchymal stem cells (MSCs - tumor-associated fibroblasts) and the extracellular matrix (ECM) (Korkaya, Liu, and Wicha 2011) (Das et al. 2017). ECM participates in multiple biological events including the regulation of cell proliferation and migratory behavior. ECM degradation by matrix metalloproteinases (MMPs) and the expression of the ECM receptors such as the integrins on the surface of the tumor and endothelial cells are critical steps for angiogenesis and metastasis (Harisi and Jeney 2015) (Clapp et al. 2009).

ECM is composed of biomolecules such as collagen, laminin, glycoproteins and proteoglycans that are mainly produced by fibroblasts and endothelial cells (Schultz and Wysocki 2009). In this context, vitronectin (VN) and fibronectin (FN) are key ECM proteins due to their ability to integrin binding, triggering key events such as changes in cell polarity and motility, survival and proliferation (Bae et al. 2012) (Zollinger and Smith 2017).

Tissue levels of VN increase in pathophysiologic conditions associated with acute inflammation contributing to organ injury, such as in cancer. VN is a multifunctional glycoprotein that binds to various biological receptors. The somatomedin B domain (SMB) of VN binds the urokinase receptor while the hemopexin domain interacts with heparin and collagen (Bae et al. 2012) (Hwang et al. 2014). FN is secreted and polymerized in plasma or interstitial liquid by the endothelium or liver, respectively (Kumra and Reinhardt 2016). Two isoforms are observed in the tumor environment, the extra domain-A and -B (EDA and EDB), both involved in angiogenesis. The Arg-Gly-Asp (RGD) adhesive motif is present in different domains of FN and VN and interacts with some integrins, mainly the $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ (Kumra and Reinhardt 2016).

Integrins are transmembrane receptors composed of different combinations of 18 α and 8 β subunits forming 24 heterodimers. Eight subgroups recognize the RGD sequence in the native ligands (Barczyk et al. 2010) (Guo and Giancotti 2004). FN contains the RGD motif and the PHSRN peptide sequence that interacts simultaneously with $\alpha_5\beta_1$ integrin, conferring high affinity binding. In contrast, only the RGD loop of FN interacts with $\alpha_v\beta_3$ integrin, which preferentially binds to VN rather than FN (Wang et al. 2016).

The process of cell migration is mostly affected by a balance between the $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins. The $\alpha_v\beta_3$ integrin activates Rac1 and the integrin $\alpha_5\beta_1$ activates RhoA, but the activation of Rac1 and

RhoA is differently regulated in the protrusive front and retracting rear of the cell body. More specifically, Rac1 drives the formation of lamellipodium in front of cells while RhoA induces actin/myosin complex contraction in the rear of cells (Huvneers and Danen 2009) (Danen et al. 2005). The blockage of either $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ integrins leads to an interchange in receptor profile.

Cilengitide, a synthetic peptide with a RGD motif that antagonizes integrins, especially $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$, increases VEGFR2 levels in endothelial cells. It also promotes recycling between $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ in ovarian carcinoma (Caswell, Vadrevu, and Norman 2009) (Mas-Moruno, Rechenmacher, and Kessler 2011) (Caswell et al. 2008) (Reynolds et al. 2009).

Cilengitide has been used in patients with highly vascularized tumors such as pancreas tumor in phase II study and glioblastoma in phase III study, however preliminary results indicate no changes in overall patient survival suggesting that cilengitide can be most effective before metastasis. Recently, patients with solids tumors, such as breast cancer, have been treated with cilengitide in phase I study (Friess et al. 2006) (Lombardi et al. 2017) (Haddad, et al. 1999) (Hariharan et al. 2007).

Viperidae snake venoms contain several integrin antagonists, named disintegrins, derived by proteolysis from precursors named snake venom metalloprotease (SVMP). Classification of disintegrins can be also according to each motif disintegrins present such as RGD, MLD or R/KTS (Fox and Serrano 2008). The effects caused by integrin inhibition upon treatment with this class of compounds became an important target on efforts to develop new drugs, such as Aggrastat®, a disintegrin with RGD motif used commercially to treat myocardial infarction through platelet fibrinogen receptor binding to integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ and $\alpha_v\beta_3$ (Calvete 2013) (Macêdo et al. 2015).

Furthermore, RGD-disintegrins can affect angiogenesis in tumors, as the two highly homologous disintegrins (CC5 and CC8) and r-mojastin 1 from the venom *Cerastes cerastes* and *Crotalus scutulatus scutulatus*, respectively. Disintegrins CC5 and CC8 (also containing WGD) interfere in cell viability, adhesion, migration and angiogenesis of HMEC-1 and HBMEC (Human Brain/Microvascular Endothelial Cells). While r-mojastin (RGDWN) and its mutant (RGDD_) inhibit cell proliferation in a human melanoma cell line (SK-Mel-28) (Ben-mabrouk, Zouari-kessentini, and Montassar 2016) (Ramos et al. 2016) (Crotalus et al. 2012).

In the present study, we used DisBa-01, a recombinant RGD disintegrin from the Brazilian snake *Bothrops alternatus*. DisBa-01 has high affinity to $\alpha_v\beta_3$ integrin and promotes anti-angiogenic, anti-metastatic and anti-thrombotic proprieties in animal models (Ramos et al. 2008) (Montenegro et

al. 2017) (Kauskot, et al. 2008). In endothelial cells, *DisBa-01* inhibits proliferation and impairs VEGF signaling and response, blocking VEGFR2 downstream signaling. *DisBa-01* also inhibits breast (MDA-MB-231 cell) and prostate (DU-145 cell) cancer cell migration, lung melanoma metastasis and sponge-induced-fibrovascular tissue in mice (Montenegro et al. 2012) (Selistre-de-Araujo et al. 2010) (Cassini-Vieira et al. 2014) (Ramos et al. 2008). In the presence of *DisBa-01* oral squamous carcinoma cells (OSCC) lose directionality and increase focal adhesion in FN coating (Montenegro et al. 2017). Recently, we reported that *DisBa-01* does not induce anoikis, a type of cell death induced by cell detachment. Instead, it induced autophagy in 4T1BM2 cells treated with this disintegrin (Lino, et al. 2019). In addition, *DisBa-01* impairs the response of endothelial cells to VEGF, blocking the activation of VEGFR2 downstream signaling (Taís M. Danilucci et al. 2019).

Taken together, our previous results confirm a direct effect of *DisBa-01* on cells through integrin binding and inhibition of downstream signaling. However, a possible interaction of this disintegrin with the ECM compounds, mainly FN, VN and collagen, has not been addressed yet.

Our hypothesis is that *DisBa-01*, besides binding to integrins, could also bind to ECM components, acting as an anchor between ECM and the cell, so it would keep the cell partially attached with decreased motility. For that, we used surface plasmon resonance (SPR) to investigate the binding properties of *DisBa-01* to purified ECM components and fluorescent cell-based assays.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Expression and Purification *DisBa-01*

Recombinant disintegrin *DisBa-01*, a His-tag protein (GenBank accession AY259516) was produced from a cDNA venom gland library of a *Bothrops alternatus* snake, as previously described [Ramos et al., 2008] (Ramos et al. 2008). Briefly, pET28-a plasmid cloned with *DisBa-01* gene were transformed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and induced by thio-b-D-galactopyranoside (IPTG, 100mM, - Sigma) for 3 hours. The culture cell was centrifuged (27,500g; 15 min, 4 °C) and resuspended in binding buffer (40 mM Tris, 0.5 M NaCl and 5mM Imidazole) and sonicated (6 times, 4 °C, 10 s interval).

The soluble cellular fraction was obtained by centrifugation (27,500g; 15 min) and suspended in

binding buffer containing 6 M urea and incubated in ice bath for one hour (4 °C). Cell lysis extract was purified by three-step chromatographic process, using an affinity column (HIS-Select® Nickel Affinity Gel, Sigma-Aldrich®), followed by size-exclusion chromatography (Superdex 75 10/300 GL, GE Healthcare) and an anion exchange column (Mono-Q 5/50 GL, GE Healthcare). Total protein was determined by colorimetric detection of bicinchoninic acid assay (Pierce™ BCA Protein Assay, Thermo Scientific).

1.2. Biospecific interaction analysis (BIA)

2.2.1 Fluorescence analysis of *DisBa-01* direct binding to fibronectin and vitronectin

To perform the assay of the direct *DisBa-01* binding to FN and VN by fluorescence, we firstly labelled the *DisBa-01* with Alexa Fluor 546 dye (ThermoFisher Scientific) in sodium bicarbonate, pH 8.3 in dimethylformamide according with instructions of the manufacturer. At the same time, plates were coated with fibronectin (5 µg/cm²) and vitronectin (0.1 µg/cm²), at 4°C overnight. After, it was added BSA (Bovine Serum Albumin – Sigma) to the wells and plates were incubated at 37 °C for 1 hour. Then, fluorescent stained *DisBa-01* (0.05 - 1.5 µM) was applied to immobilized FN and VN in 96-well black plates (Corning Incorporated 3603), followed by incubation for 1 hour at 4°C. To avoid inespecific interactions, the wells were washed with PBS (200 µL) for 3 times. The images were captured in image-X-press and quantified by Analyses Transfluor – Pit Integrated Intensity, 6 module, software MetaXpress.

2.2.2 Surface plasmon resonance (SPR)

The affinity of *DisBa-01* to immobilized FN and VN (Sigma) was measured using SPR (BIAcore T200; GE Healthcare, Little Chalfont, UK). FN and VN were covalently attached via amine coupling to sensor chip CM5(GE Healthcare, Little Chalfont, UK). After testing the sensor chip in a pH gradient (pH Scouting), FN and VN presented at pH 4.0 best performance. The FN (60 µg/mL) and VN (30 µg/mL) in acetate buffer containing 0.01 M Hepes, pH 7.4, 0.15 M NaCl, and 0.005 %, were immobilized on the sensor chip surface, resulting in 2108.1 Resonance Unit (RU) and 781.9 RU, respectively. *DisBa-01* (0.1 to ± 7 µM) was diluted in phosphate-buffer saline (PBS) at 25°C and injected at flow rate of 15 µL/min in the sensor chip with both immobilized FN and VN.

Chip regeneration was performed by injection of Gly HCl 2M, pH 2.0 for 10s. Association and dissociation constant rates were calculated by curve fitting, using BIA evaluation software (v. 1.1) assuming that DisBa-01 (analyte) is monomeric with a MR of 12,000 Da. Association constant between DisBa-01 and the FN and VN were calculated using GraFit 5.0 software

2.3.1. Cell culture

HUVEC cell line was obtained from the American Type Culture Collection [ATCC CRL-1730], and routinely maintained in DMEM (Nutricell), pH 7.4 cell culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS - Vitrocell) at 37 °C and 5%CO₂/air atmosphere. Serial passages (12 to 18) were carried out by treatment of 80% confluent monolayers to trypsin-EDTA 0.1% (Sigma).

2.3.2 Fluorescence Analysis of DisBa-01 interaction in HUVEC

Cells were seeded (10⁵ cells) on 12 mm glass coverslips (KASVI) in 24-well plates and incubated overnight at 37 °C 5% CO₂/air atmosphere. The next day, cultures were treated with fluorescent-labelled DisBa-01 1µM for 5 minutes at room temperature. Then the cells were fixed 20 minutes with 4% paraformaldehyde (PFA) and nuclei were stained with DAPI for 10 minutes. Samples were mounted in ProLong Diamond Antifade Mountant (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). Fluorescence images were acquired in Image-X-press microscope (Molecular Devices), using magnifying lens 20x and 60x.

2.3.3.1 Immunofluorescence analysis

Cells were seeded (10⁶ cells) on 12 mm glass coverslips (Exacta) in 24-well plates (KASVI K12-024) or 4 x 10⁵ cells were seeded in culture chambers (Lab-Tek Slide w/ Cover Glass Slide Sterile), previously coated with FN 5 µg/cm² in PBS, and kept at 37°C and 5%CO₂ incubator. Cells were subsequently treated or not with cilengitide 1µM (Sigma) for 1 hour in PBS at 37°C 5%CO₂. DisBa-01 (0.01, 0.1, 1µM) was incubated for 2 minutes in HUVEC. Cells were fixed 20 minutes with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS, permeabilized for 10 minutes with triton x-100 0,3% in PBS, blocked with 100 mM glycine solution for 5 minutes and 1 hour with BSA 2% in PBS. Primary antibodies diluted in blocking buffer were added and the plate incubated for 1 hour at room temperature or overnight at 4°C. After washing, secondary antibodies were incubated in blocking buffer for 1 hour at temperature room. Cells were stained with DAPI for 20 minutes. Samples were

mounted in ProLong Diamond Antifade Mountant (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). Antibodies used were mouse monoclonal to the integrin $\alpha_v\beta_3$ (abcam – ab78289); mouse monoclonal to the integrin $\alpha_5\beta_1$ (LSBio – C70775); rabbit polyclonal to the fibronectin (abcam - ab2413); rabbit monoclonal to the vitronectin (abcam ab45139). Secondary antibodies used were goat polyclonal anti-mouse FITC (abcam – ab6785), goat polyclonal anti-mouse Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific – 11001a), goat anti-rabbit Alexa 633 (Thermo Fisher Scientific – A21070). All antibodies were centrifuged for 10,000 g at 4°C, 45 minutes before dilution in BSA 2% in PBS.

Confocal laser scanning microscopy images were acquired in an Axio Observer (Zeiss, Jena, Germany), LSM 780 System, software ZEN BLACK or Fluoview, FV10 (Olympus), version 2.10 F10, using same laser intensity, with zoom 2x- magnifying lens 63x and 1 oil immersion objective. FijiImageJ program was used to construct and analyses the images. Images were assembled and analyzed using software FIJI (Schneider et al. 2017) (SCHINDELIN, 2012). Quantification of Manders's overlap, tM1, coefficients was performed using Colocalization Threshold and for DisBa-01 x $\alpha_v\beta_3$ complex, we used the JaCoP plugin from FijiImageJ.

2.4 Profile of $\alpha_v\beta_3$ integrin, β_3 , α_5 , β_1 Integrin Subunit by Flow Cytometry

Cells (1×10^6) were incubated without and with DisBa-01 for 5 minutes following cells are harvested and centrifuged at 400 g in 4 °C. HUVECs were incubated with primary antibody of integrin beta 3 (sc52685- 1 μ g), alpha 5 (sc13547 - 1 μ g) e beta 1 (sc13590) and $\alpha_v\beta_3$ integrin (sc7312 - 1 μ g) for 1h and washed and incubated with polyclonal anti-mouse FITC (abcam – ab6785) for 1h. Results was analysed in flow cytometer (BD Accuri™ C6)

2.5 Statistical analysis

We used Statistical Program GraphPad (v. 8.0) or Sigma Plot (v. 12.0) software. followed One Way Analysis of variance on ANOVA– Tukey Test to normal distribution data or Kruskal–Wallis one-way analysis of variance on ranks post hoc Dunn test to non-parametric data. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. Data obtained from at least three independents series of experiments.

3. RESULTS

3.1 DisBa-01 binds to the isolated ECM components VN and FN

To determine whether the disintegrin is able to interact with ECM components, labeled DisBa-01 (Alexa Fluor 546) was applied directly on FN and VN coatings. In both FN (Fig.1A) or VN (Fig.1B), increasing DisBa-01 concentrations resulted in an augment of fluorescence intensity, indicating that the protein bound to the coatings was in a concentration-dependent manner with $EC_{50} = 0.270 \mu\text{M}$ and $0.287 \mu\text{M}$ to FN and VN, respectively.

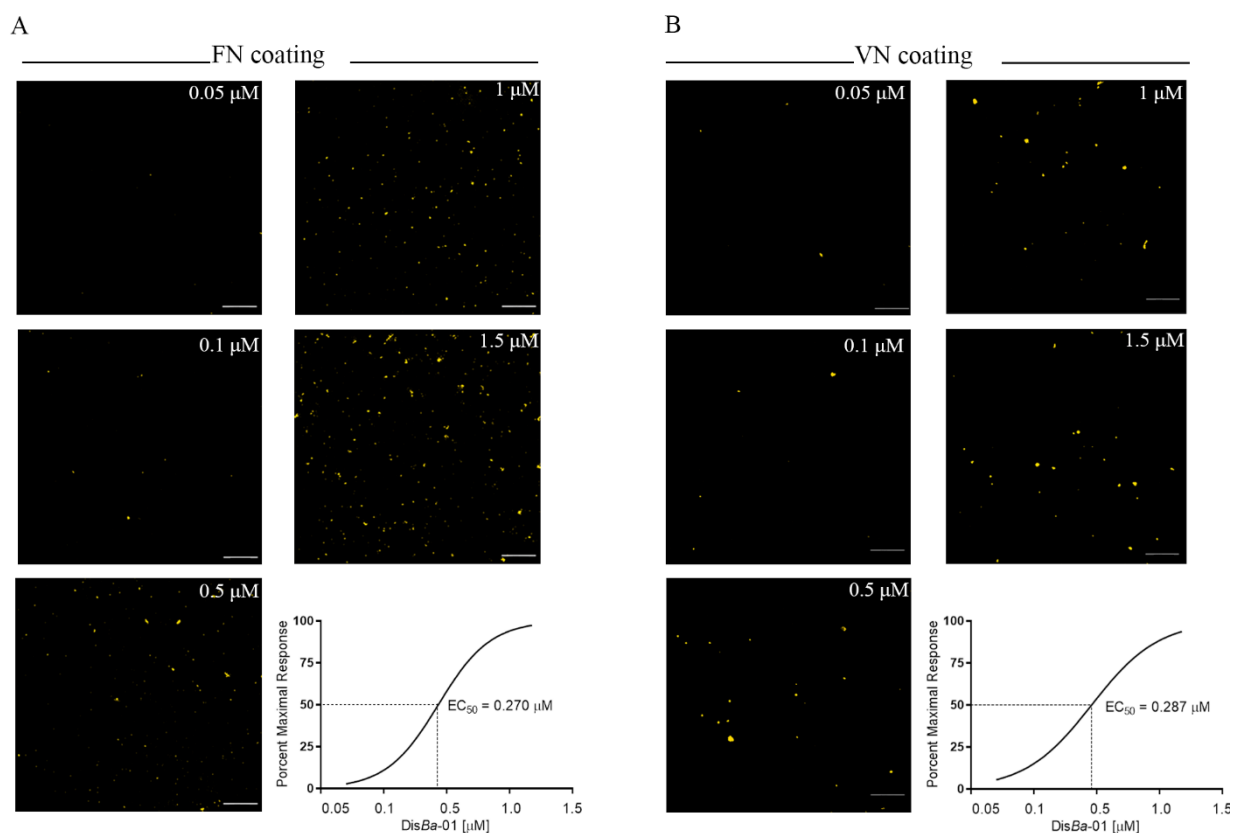


Figure 1) Binding of labeled DisBa-01 in FN and VN coating. Representative images of the interaction between different concentrations of Alexa Fluor 546-labeled DisBa-01 with (A) FN and (B) VN coating. Sum of Pixel Integrated Intensity of each selected concentration was transformed in Log_{10} following Log (agonist) vs. normalized response - Variable slope to DisBa-01 x FN and VN. Graphics are represented Percent Maximal Response x concentration of DisBa-01. Data on three independent experiments performed in triplicates or duplicates. (Scale bar: 100 μm).

3.2 Interaction between the DisBa-01 with FN and VN by SPR

We also evaluated the binding ability of DisBa-01 to FN and VN by SPR. The interaction between the recombinant RGD disintegrin to the two distinct coatings was similar and affinity constant determined showed very close values for DisBa-01 with FN as 4.61×10^{-6} M (Fig.2A) and 4.8×10^{-6} M for VN (Fig.2B).

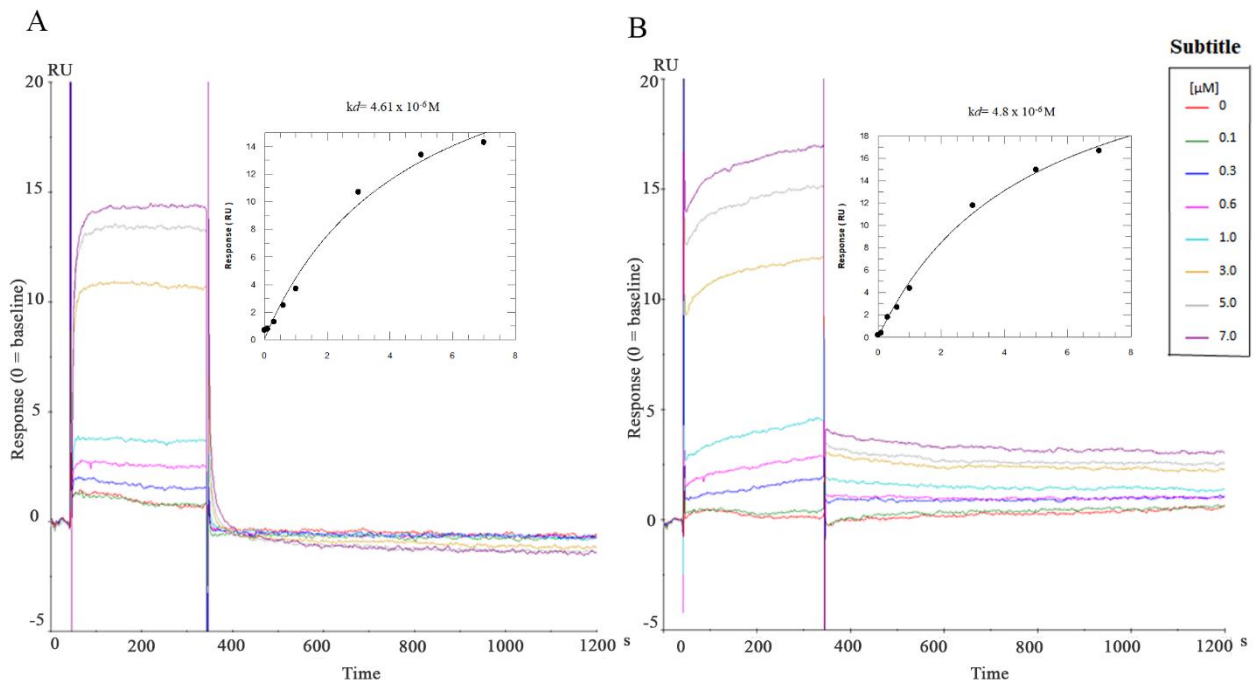


Figure 2) Interaction of DisBa-01 (0 μ M - 7 μ M) with FN and VN. Concentration curve of DisBa-01 binding to immobilized FN (A) and VN (B). SPR = RU x time. $K_d = \text{RU (Resonance Units)} \times \text{Concentration of DisBa-01 } (\mu\text{M})$

3.3 Fibronectin coating promotes change on DisBa-01 internalization in HUVEC cells

To investigate the relevance of DisBa-01 localization in cells, we carried out analyze with Alexa Fluor 546-labeled DisBa-01 in HUVEC cells. After incubation of fluorescent DisBa-01 with HUVEC for 5 minutes without protein coating, it was possible to visualize the perinuclear localization of the internalized protein. Moreover, protein localization showed a polarization pattern on cells, suggesting clusters of the disintegrin (Fig. 3A-B). To track the binding of DisBa-01 with possible integrins on the cell surface, the incubation time was decreased to 2 minutes, using both FN coated and non-coated conditions. Cells plated over FN coated showed more DisBa-01 (0.1, 0.5, 1 μ M) signals inside, surrounding cells and in FN coating (Fig. 3C-D-E), while non-coated conditions revealed diminished protein signals, like specific points, in cells (Fig. 3F-G).

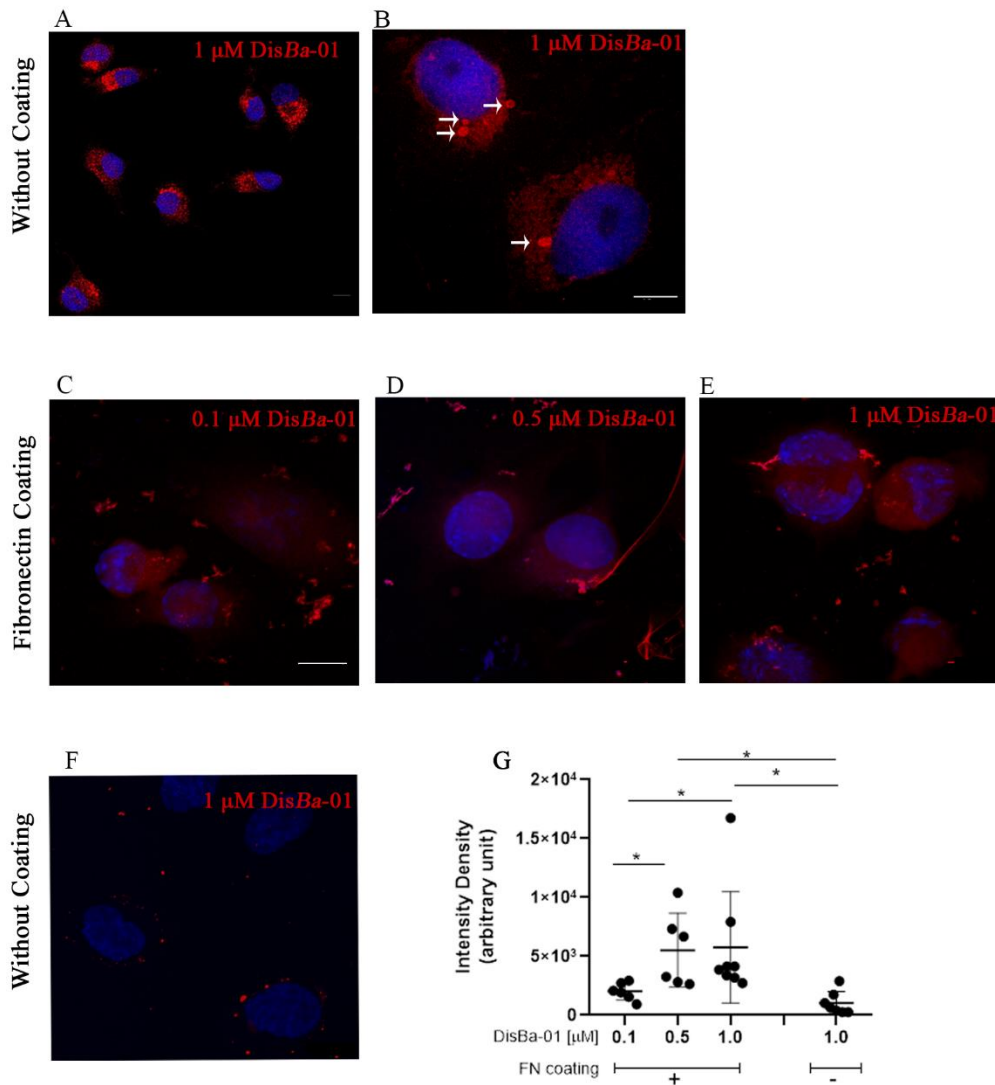


Figure 3) Fluorescence analysis of DisBa-01 localized in HUVEC and the influence of FN coating. A - B) Epifluorescence image of DisBa-01 (red) incubated for 5 minutes with HUVEC cells without coating. Magnification of 20 (left) and 60x (right) (Scale bar: 100 and 10 μm). C-D-E) Confocal images of DisBa-01 incubated for 2 minutes in HUVEC with the presence of FN coating. F) Confocal images of DisBa-01 incubated for 2 minutes in HUVEC without FN Coating. G) Quantification of integrin intensity density of DisBa-01 in HUVEC with and without coating for figures C-D-E-F. Kruskal–Wallis one-way analysis of variance on ranks post hoc Dunn test (Scale bar: 10 μm).

3.4 DisBa-01 colocalizes with $\alpha_v\beta_3$ integrin in FN coated surface

Previously published results of SPR showed that DisBa-01 has high affinity with $\alpha_v\beta_3$ integrin (k_d

4.63×10^{-7} M) (C.F. Montenegro et al. 2017). For a better understanding of the interaction of *DisBa-01* with cells, we performed colocalization studies between this RGD-disintegrin with the $\alpha_v\beta_3$ integrin from HUVEC in FN coating.

Concentrations of *DisBa-01* (0.1 - 1 μ M) clearly demonstrated colocalization with $\alpha_v\beta_3$ integrin in FN coating (Fig. 4A-B-C). This RGD-disintegrin also binds outside cells, mainly in higher concentrations, confirming the results observed in Fig. 1.

To observe whether the results obtained so far were product of *DisBa-01*- $\alpha_v\beta_3$ interaction, we treated adhered HUVEC cells with cilengitide (1 μ M) prior to incubation with labeled *DisBa-01* (2 min) (D-E-F). The colocalization between *DisBa-01* at the tested concentrations and $\alpha_v\beta_3$ integrin remained stable upon treatment without/with cilengitide (Fig. 4G) In this way, the inhibitor of $\alpha_v\beta_3$ integrin did not influence the interaction between *DisBa-01* with this integrin (Fig. 4B). In absence of *DisBa-01*, $\alpha_v\beta_3$ integrin is increased with cilengitide treatment for 1 hour in HUVEC (Fig. 4H-I-J). Hence, we can infer that $\alpha_v\beta_3$ integrin was blocked by cilengitide, but this integrin was able to return after this period for cell.

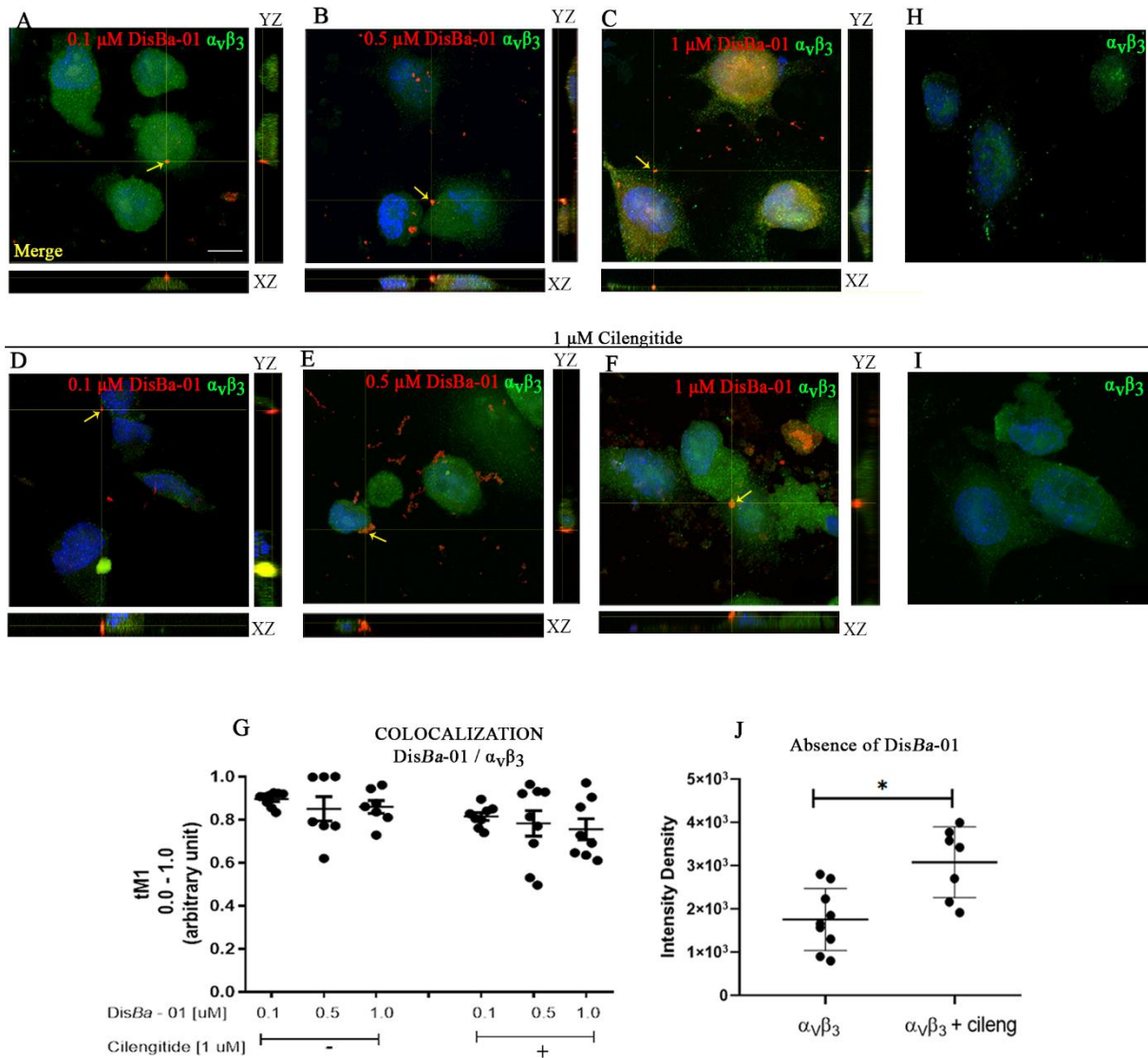


Figure 4) *DisBa-01* colocalizes with $\alpha_v\beta_3$ integrin from HUVEC cells in FN coating. A-B-C) Colocalization between different concentrations of the *DisBa-01* (red) with $\alpha_v\beta_3$ integrin (green) in FN coating from HUVEC. D-E-F) HUVEC was treated with cilengitide for 1 hour following the colocalization between different concentrations of the *DisBa-01* with $\alpha_v\beta_3$ integrin in FN coating. G) Quantification of *DisBa-01* colocalization with $\alpha_v\beta_3$ integrin in FN coating, with or without cilengitide treatment. tM1: Manders Overlap Coefficient using a threshold. ANOVA followed by Tukey's test. H) Representative images of HUVECs and labeled $\alpha_v\beta_3$. I) Representative images of HUVECs treated with Cilengitide and labeled $\alpha_v\beta_3$. J) $\alpha_v\beta_3$ integrin with Cilengitide treatment and without *DisBa-01* from HUVEC. I) Quantification of integrin intensity density in untreated HUVECs and Cilengitide-treated cells (Scale bar: 10 μm).

3.5 *DisBa-01*- $\alpha_v\beta_3$ integrin complex colocalizes with FN/VN coated under HUVEC

The interaction between integrins with ECM compounds, such as binding between $\alpha_v\beta_3$ integrin and VN/FN, promotes changing in cell polarity and cytoskeletal structure organization (Shattil S

F, Kim C, and Ginsberg M H 2010). We showed that *DisBa-01* binds to FN/VN and colocalizes with $\alpha_v\beta_3$ integrin in FN coating, however if *DisBa-01*- $\alpha_v\beta_3$ integrin complex colocalizes with FN/VN in HUVEC it was not elucidated. Firstly, we observed the *DisBa-01*- $\alpha_v\beta_3$ integrin complex, then the colocalization between *DisBa-01* with FN and finally, the *DisBa-01*- $\alpha_v\beta_3$ integrin complex with FN coating (Fig.5-A-B-C-D). We also performed this complex with VN coating, the colocalization between *DisBa-01* and VN and *DisBa-01*- $\alpha_v\beta_3$ integrin complex with VN coating in HUVEC (Fig. 5 E-F-G-H). Both *DisBa-01* and the *DisBa-01*- $\alpha_v\beta_3$ integrin complex colocalize with FN and VN coating in HUVEC. We also observed that the FN and VN are more around in HUVEC (nucleus is represented in blue), in presence and absence of *DisBa-01* (Fig. 5-I-J).

3.6 Colocalization between *DisBa-01*- $\alpha_v\beta_3$ integrin complex and FN/VN in HUVEC without coating

Endothelial cells endogenously express proteins such as FN and VN, so we pondered how the interaction between *DisBa-01* and extracellular matrix proteins FN/VN produced by HUVECs, occurs in uncoated surfaces. *DisBa-01* colocalizes strongly with basal FN, but colocalization between *DisBa-01*- $\alpha_v\beta_3$ integrin complex with FN was not as strong (Fig. 6 A-B-C-D). This finding may have been related with $\alpha_v\beta_3$ preference VN ligand than FN, beyond that signals from FN and VN in HUVEC. *DisBa-01* also colocalizes with basal VN similarly to how the *DisBa-01*- $\alpha_v\beta_3$ integrin complex does with VN (Fig. 6-E-F-G-H). We observed that signals from FN is robuster than VN in HUVEC (nuclei are represented in blue) around endothelial cells without coating (Fig. 6-I-J-K).

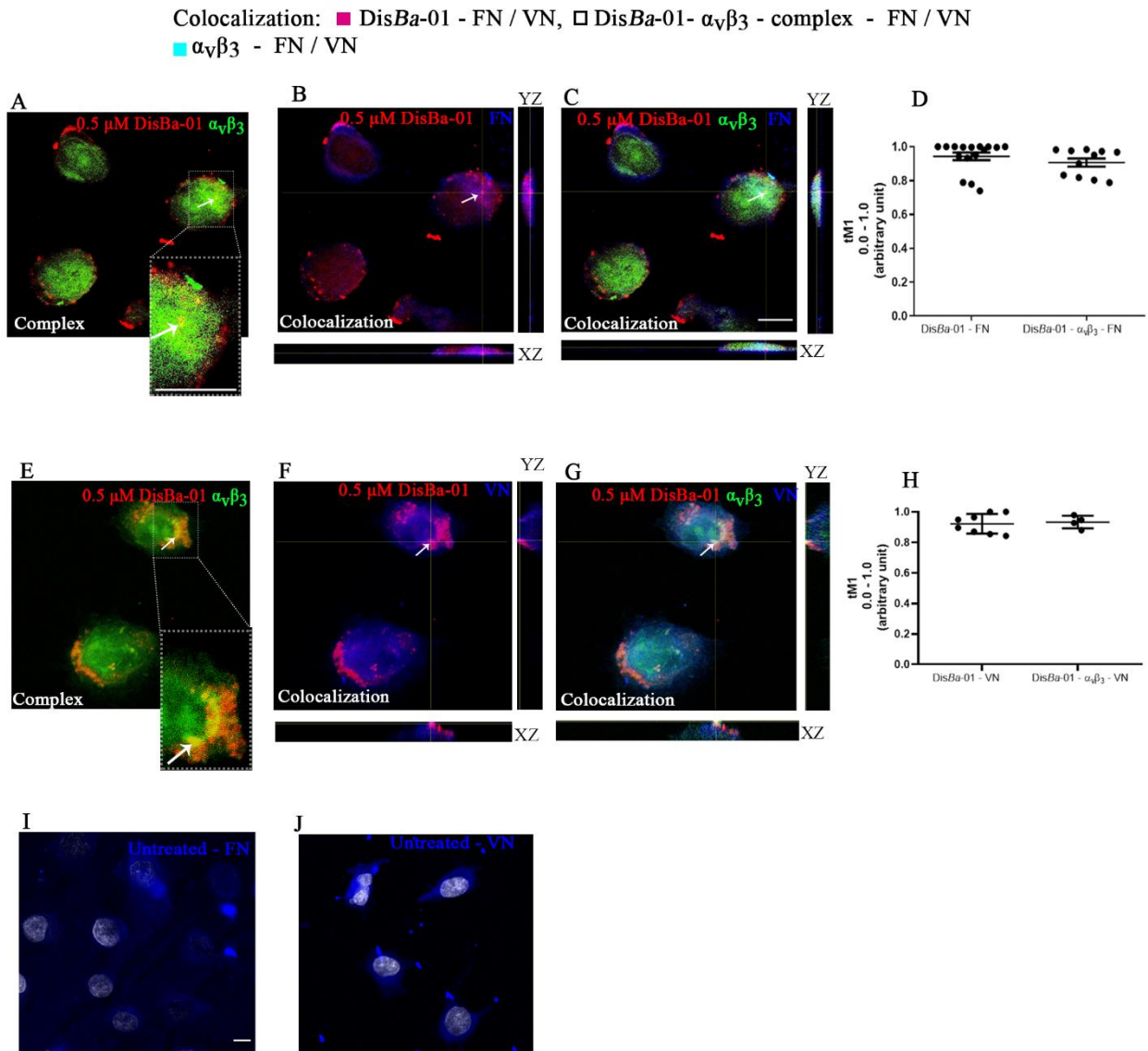


Figure 5) DisBa-01 and DisBa-01- $\alpha_v\beta_3$ integrin complex colocalize with FN/VN coating in HUVEC. A) DisBa-01 (red) and $\alpha_v\beta_3$ integrin (green) form a DisBa-01- $\alpha_v\beta_3$ integrin complex (yellow) in FN coating. B) Colocalization between DisBa-01 and FN coating (blue). C) Colocalization between DisBa-01, integrin and FN coating (white). D) Quantification of colocalization. tM1: Manders Overlap Coefficient using threshold to DisBa-01 with FN. For colocalization between DisBa-01 - $\alpha_v\beta_3$ integrin – complex with FN was used tM1 from JACoP plugging. Statistical data analysis by ANOVA one-way followed by Tukey's post-hoc test. E) DisBa-01 (red) and $\alpha_v\beta_3$ integrin (green) forming a DisBa-01- $\alpha_v\beta_3$ integrin complex (yellow) in VN coating. F) Colocalization between DisBa-01, integrin and VN coating (white). G) Colocalization between DisBa-01 and $\alpha_v\beta_3$ integrin formed by DisBa-01 - $\alpha_v\beta_3$ integrin – complex and VN coating. H) Quantification of colocalization. tM1: Manders Overlap Coefficient using threshold for DisBa-01 and VN. For DisBa-01- $\alpha_v\beta_3$ integrin complex and VN, tM1 from JACoP plugin was used. I) Untreated cells with FN coating. J) Untreated cells with VN coating.

Statistical data analysis by ANOVA one-way followed by Tukey's post-hoc test. I) FN without *DisBa-01* and $\alpha_v\beta_3$ integrin J) VN without *DisBa-01* and $\alpha_v\beta_3$ integrin. (Scale bar: 10 μ m).

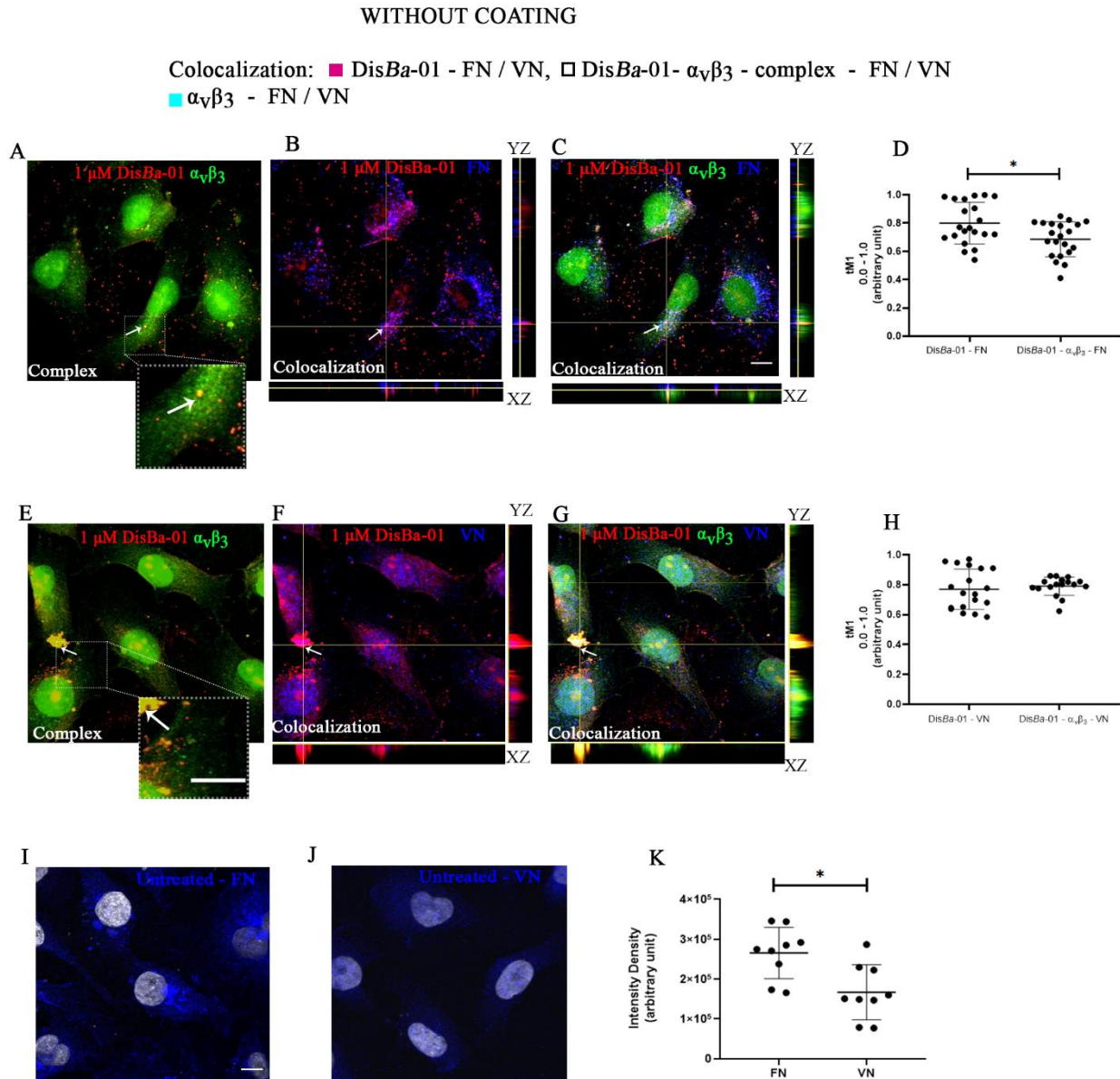


Figure 6) *DisBa-01* and *DisBa-01*- $\alpha_v\beta_3$ integrin complex colocalizes with FN/VN in HUVEC. A) *DisBa-01*(red) and $\alpha_v\beta_3$ integrin (green) forming the *DisBa-01*- $\alpha_v\beta_3$ integrin complex (yellow). B) Colocalization between *DisBa-01*and basal FN. C) Colocalization between *DisBa-01*, integrin and basal FN (white). D) Quantification of colocalization. tM1: Manders Overlap Coefficient using threshold to *DisBa-01* with FN. For, colocalization between *DisBa-01* - $\alpha_v\beta_3$ integrin – complex with FN was used tM1 from JACoP plugging. Statistical data analysis by ANOVA one-way followed by Tukey's post-hoc test. E) *DisBa-01*(red) and $\alpha_v\beta_3$ integrin (green) forming the *DisBa-01*- $\alpha_v\beta_3$ integrin complex (yellow). F) Colocalization between *DisBa-01*, integrin and basal VN. G) Colocalization between *DisBa-01*, integrin and basal VN. H) Quantification of colocalization. tM1: Manders Overlap Coefficient using threshold to *DisBa-01* with VN. For, colocalization between *DisBa-01* - $\alpha_v\beta_3$ integrin – complex with VN was used tM1 from JACoP plugging. Statistical data analysis by ANOVA one-way followed by Tukey's post-hoc test. I) FN without *DisBa-01* and $\alpha_v\beta_3$ integrin. J) VN without *DisBa-01* and $\alpha_v\beta_3$ integrin. (Scale bar: 10 μ m). K) Intensity Density of FN and VN. Statistical data analysis by ANOVA one-way followed by Tukey's post-hoc test.

(white). G) Colocalization between DisBa-01- $\alpha_v\beta_3$ integrin complex and VN. H) Quantification of colocalization. tM1: Manders Overlap Coefficient using threshold for DisBa-01 and VN. For DisBa-01- $\alpha_v\beta_3$ integrin complex and VN, tM1 from JACoP plugin was used. I) FN without DisBa-01 and $\alpha_v\beta_3$ integrin J) VN without DisBa-01 and $\alpha_v\beta_3$ integrin. K) Quantification of FN and VN intensity density in untreated HUVEC. Statistical data analysis performed using ANOVA one-way followed by Tukey's post-hoc test (Scale bar: 10 μm).

3.6 DisBa-01 colocalizes with $\alpha_5\beta_1$ integrin in HUVEC.

We have previously demonstrated that DisBa-01 has lower affinity towards $\alpha_5\beta_1$ integrin (k_d : 7.62 x 10⁻⁵ M), compared with $\alpha_v\beta_3$ integrin (MONTENEGRO et al., 2017). To investigate the possibility of binding between DisBa-01 to $\alpha_5\beta_1$ integrin in HUVEC via colocalization assays, we performed colocalization studies. Confocal image analysis showed that DisBa-01, in addition of $\alpha_v\beta_3$ integrin binding, also colocalizes with $\alpha_5\beta_1$ integrin, as indicated by the Mander's coefficients (Fig. 7A-B-C). Visual analysis of each fluorescent-labelled protein in separated channels confirmed their whereabouts (Fig. 7-D-E-F-G). Furthermore, we denoted stronger signals from $\alpha_5\beta_1$ than $\alpha_v\beta_3$ integrin without DisBa-01 in HUVEC (Fig. 7-H-I-J)

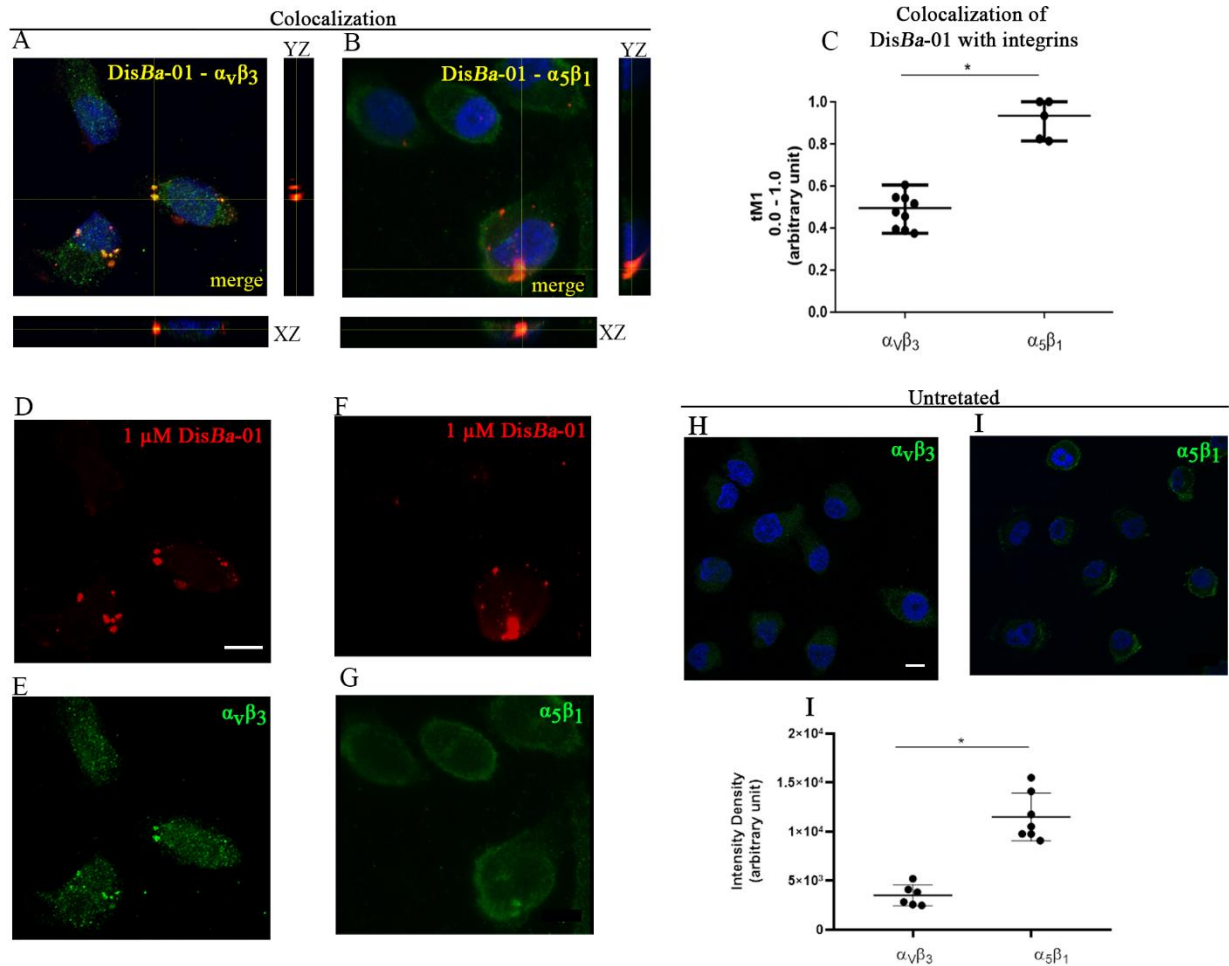


Figure 7) Colocalization between DisBa-01 with $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins in HUVEC. A) Colocalization between DisBa-01 (red) and $\alpha_v\beta_3$ integrin (green). B) Colocalization between DisBa-01 and $\alpha_5\beta_1$ integrin (green). C) Quantification of DisBa-01 colocalization with integrin $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ using tM1 (Manders overlap coefficient using threshold). Statistical data analysis performed using ANOVA one-way followed by Tukey's post-hoc test. D-E-F-G) Different channels of DisBa-01, $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins. H) $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrin untreated. I) Quantification of $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrin intensity density in untreated HUVEC. Statistical data analysis performed using ANOVA one-way followed by Tukey's post-hoc test

3.7 Profile of integrins in HUVECs in the presence and absence of DisBa-01

To better understand DisBa-01 binding properties, we investigated the profile of integrins expression in HUVEC by flow cytometry. Endothelial cells express higher levels of α_5 (75%) and β_1 (93%) integrin subunits than $\alpha_v\beta_3$ (25%) integrin and β_3 subunit alone (50%) (Fig. 8-A). However, we observed an increase in $\alpha_v\beta_3$ and β_3 integrins when cells were treated with DisBa-01 for 5 minutes (Fig. 8-B-C). Protein levels of subunits α_5 and β_1 were not affected by DisBa-01 presence (Fig. 8-D-E).

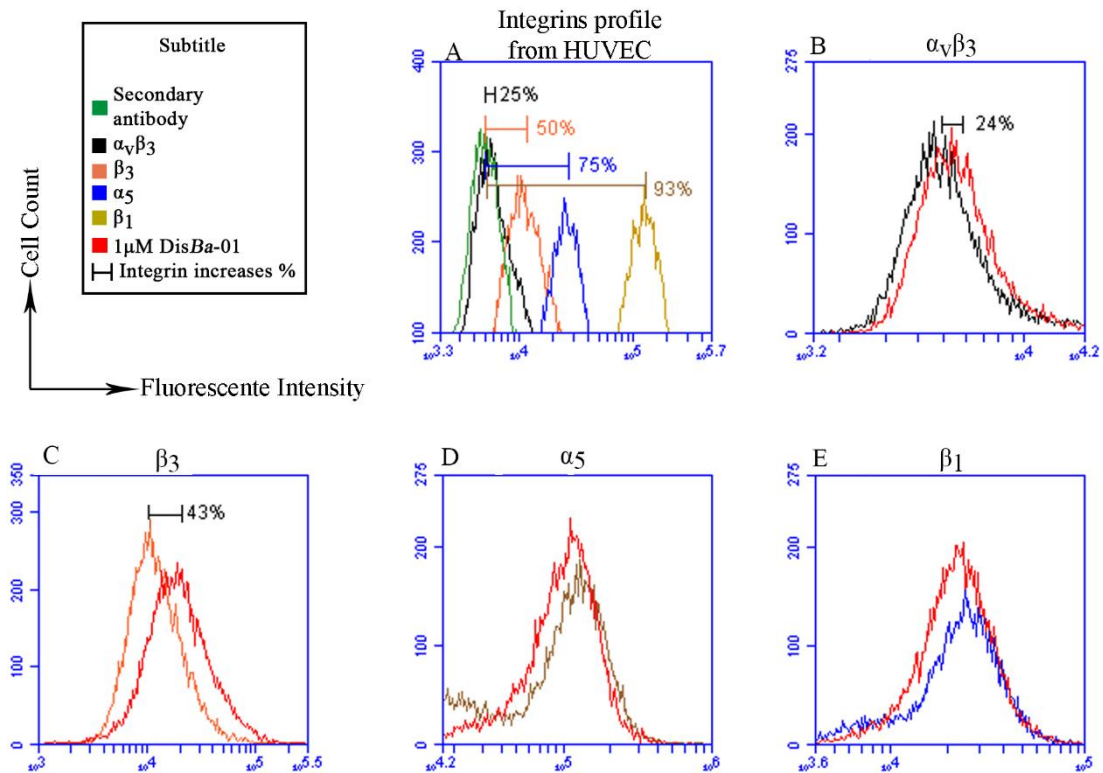


Figure 8) Integrin protein expression in HUVECs. $\alpha_v\beta_3$, β_3 , α_5 , β_1 integrins in HUVEC by Flow Cytometry. A) Profile of integrin expression, showing $\alpha_v\beta_3$ (black), β_3 (orange), α_5 (blue) and β_1 (beige) with comparative quantification (percentage shown above) of negative control (green, only secondary antibody). B) Expression of integrin $\alpha_v\beta_3$ increases by 24% upon DisBa-01 (red) treatment. C) Protein expression of integrin subunit β_3 increases 43% with DisBa-01 presence. D-E) Histogram denoting unchanged profile of integrins α_5 (D) and β_1 (E) after DisBa-01 exposure. HUVEC were treated with 1 μ M DisBa-01 for 5 minutes prior to collection.

4. DISCUSSION AND CONCLUSION

We have previously shown that DisBa-01 affects endothelial cells in *in vitro* assays (Danilucci et al. 2019). However, the binding mechanisms to these cells is still not completely understood. Here, we demonstrated, by using fluorescence and SPR experiments (Fig.1 and 2), that additionally to the interaction with the $\alpha_v\beta_3$ integrin, DisBa-01 is able to bind to ECM components with $k_d \cong 4 \mu$ M or 4×10^{-6} M to DisBa-01 versus VN/FN (Montenegro et al. 2017). DisBa-01 has 10 times more affinity to FN and VN than $\alpha_5\beta_1$ integrin, but it has 10 times less affinity with FN and VN than $\alpha_v\beta_3$ integrin (Ramos et al. 2008).

The interaction between $\alpha_v\beta_3$ integrin and VN was demonstrated before (Bachmann et al. 2017),

in which a $k_d < 1\text{pM}$ (10^{-9} M) was determined via biolayer interferometry. This result was also corroborated by another study, which used a solid phase receptor assay with radiolabeled VN and integrin $\alpha_v\beta_3$ coating (Orlando and Cheresh 1991).

Our results indicate that *DisBa-01* binds to ECM components 1000 times less specifically than the natural binding of integrin $\alpha_v\beta_3$ to VN. Moreover, when compared to the interaction between FN to integrin $\alpha_v\beta_3$ ($k_d = 5.3 \times 10^{-8}\text{ nM}$) (Bachmann et al. 2017) and integrin $\alpha_5\beta_1$ ($k_d = 8 \times 10^{-7}\text{ M}$) (Parisi et al. 2020) (Akiyama and Yamada 1990), *DisBa-01* is 100 times less specific in binding to FN than integrin $\alpha_v\beta_3$ and 10 time less specific than integrin $\alpha_5\beta_1$. Even so, *DisBa-01* binding to FN and VN discourages key biological responses in HUVEC such as migration and cell adhesion (T.M. Danilucci et al. 2019).

We showed clusters of *DisBa-01* binding to HUVEC perinuclear regions (Fig. 3). We suggest that *DisBa-01* binds to $\alpha_v\beta_3$ integrin in endothelial cells and is internalized in a pattern similarly found in $\alpha_v\beta_3$ integrin blockade (Pellinen and Ivaska 2006). We also found that *DisBa-01* disperses through FN coating, but clusters in uncoated surfaces. Considering FN binding activates integrins, it also increases the interactions between *DisBa-01* and endothelial cells.

Crosstalk between $\alpha_v\beta_3$ integrin and VEGFR2 is essential for angiogenesis. *DisBa-01* colocalizes with both receptors (Danilucci et al. 2019), but it is unknown whether this response is maintained with lower concentrations of the disintegrin or with the presence of Cilengitide, a cyclic RGD inhibitor of integrin $\alpha_v\beta_3$. Here, we presented that *DisBa-01* colocalizes with $\alpha_v\beta_3$ integrin in FN coating, regardless of its concentration (Fig. 4). Considering Cilengitide does not interfere with integrin $\alpha_v\beta_3$ levels in HUVEC, as demonstrated previously (Alghisi, Ponsonnet, and Rüegg 2009), we supposed it would not modify the colocalization between *DisBa-01* and integrin $\alpha_v\beta_3$. Despite their similar mechanism of action, Cilengitide is a partial, synthetic agonist that affects tumor microenvironment establishment in low nanomolar concentrations, whereas *DisBa-01* is a recombinant protein with likely antagonistic action that interferes with tubulogenesis and angiogenesis in micromolar concentrations (Li et al. 2019) (Danilucci et al. 2019) (Cassini-Vieira et al. 2014).

It is well described that HUVEC cells produce extracellular matrix, but surface coating with FN and VN can mimic conditions of the tumor environment that are key for the establishment of angiogenesis, tumorigenesis, vascularization and tumor stiffening (Wang et al. 2016) (Hielscher et al. 2016). We found that *DisBa-01* colocalizes with FN/VN and the *DisBa-01*- $\alpha_v\beta_3$ integrin

complex binds to matrix protein (Fig.5), although the disintegrin alone is preferential in FN binding. We believe that this complex is supporting the inhibitory effect of *DisBa-01* over endothelial cell migration. Interestingly, the colocalization between *DisBa-01* versus VN, and *DisBa-01*- $\alpha_v\beta_3$ integrin complex versus VN is akin (Fig. 6). Hence, we demonstrated that *DisBa-01* acts as an anchor between ECM and cells, through the binding of integrin $\alpha_v\beta_3$ and FN/VN.

To investigate whether *DisBa-01* stimulates integrin concentration immediately in HUVEC, *DisBa-01* was incubated in short periods (Caswell et al. 2009). We observed that *DisBa-01* colocalizes more with integrin $\alpha_5\beta_1$ rather than $\alpha_v\beta_3$ integrin, despite its stronger affinity to the latter. This is possibly due to the higher availability of $\alpha_5\beta_1$ in HUVECs (Fig. 7). Short-loop or fast recycling between $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins is related in fibroblast migration, prior to $\alpha_v\beta_3$ integrin blockade (White, Caswell, and Norman 2007). Nonetheless, the modulation of $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins were not described after disintegrin blockade. *DisBa-01* can interfere with the recycling of $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins and increases $\alpha_v\beta_3$ integrin in HUVEC. This effect is irrelevant for tubulogenesis and migration in presence of *DisBa-01* (De, et al. 2018).

Integrins are presented in different quantities in distinct endothelial cells, as previously demonstrated by (Micocci, et al. 2016). Here, we reveal that HUVEC has predominant integrin $\alpha_5\beta_1$ and more β_3 subunit enrichment integrin than dimer $\alpha_v\beta_3$ integrin. Both β_3 integrin subunit and $\alpha_v\beta_3$ integrin dimer increase upon treatment *DisBa-01* in short-time (Fig. 8). This interaction is probably related with the short-loop recycling pathway of the integrins after blocking $\alpha_v\beta_3$ integrin, as it is the case $\alpha_v\beta_3$ integrin blocking mentioned above (Bridgewater, Norman, and Caswell 2012). This is the first time that an increase in integrin expression has been observed after treatment with this disintegrin.

We conclude that the mechanism of *DisBa-01* to impair cell migration and angiogenesis is binding to matrix components and integrins, anchoring cells to the extracellular matrix. Therefore, we suggest that *DisBa-01* interferes in integrins-ECM interaction dynamics, immobilizing endothelial cells to form vessels.

ORCID

Casali, B.C: 0000-0002-1056-8236

Moritz, M.N.O: 0000-0003-1270-9650

Altei, W.F.: 0000-0002-6636-7951

Stozer, U.S.: 0000-0003-3325-5539

Danilluci, T.M.: 0000-0003-0768-6239

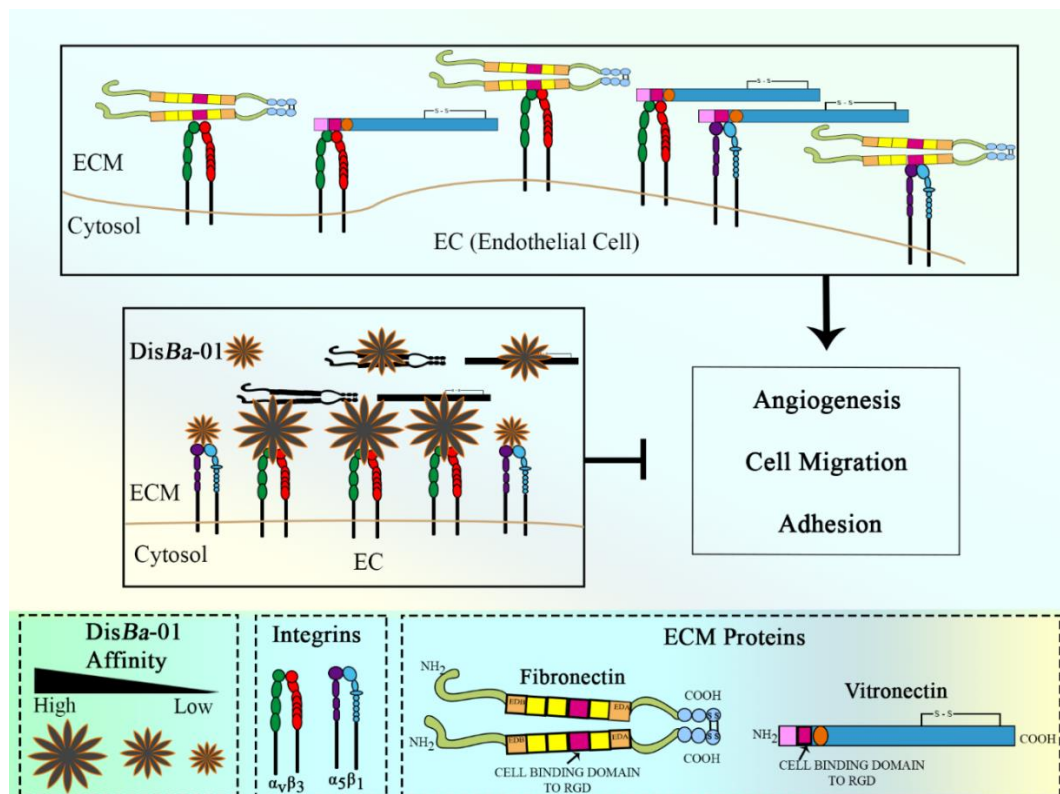
Pachane, B.C: 0000-0002-7302-4498

Selistre-de-Araújo, H.S.: 0000-0002-2372-7814

Author Contributions:

Conceptualization, Casali, B.C.; Moritz, M.N.O; Altei, W.F.; Stozer, U.S; Selistre-de-Araújo, H.S.; Investigation: Casali, B.C.; Moritz, M.N.O; Pachane, B.C; Danilluci, T.M; Formal analysis: Casali, B.C.; Moritz, M.N.O.; Altei, W.F.; Stozer, U.S.; Pachane, B.C; Selistre-de-Araújo, H.S; Supervision, Project administration, and funding acquisition: H.S.S.D.A.; Writing, review and editing: Casali, B.C; Moritz, M.N.O; Altei, W.F.; Pachane, B.C; Stozer, U.S.; Danilluci, T.M; Selistre-de-Araújo, H.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

5.GRAPHIC ABSTRACT



6. REFERENCES

- Akiyama, Steven K. and M. Yamada. 1990. "Cell Surface Receptors for Extracellular Matrix Components." 1031:91–110.
- Alghisi, Gian Carlo, Lionel Ponsonnet, and Curzio Rüegg. 2009. "The Integrin Antagonist Cilengitide Activates AV β 3, Disrupts VE-Cadherin Localization at Cell Junctions and Enhances Permeability in Endothelial Cells." *PLoS ONE* 4(2).
- Ata, Rehman and Costin N. Antonescu. 2017. "Integrins and Cell Metabolism: An Intimate Relationship Impacting Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 18(1).
- Bachmann, Michael, Markus Schäfer, Kai Weißenbruch, Vasyl V Mykuliak, Lia Heiser, Clemens M. Franz, Vesa P. Hytönen, Bernhard Wehrle-haller, and Martin Bastmeyer. 2017. "Force-Dependent Ligand Sensing Enables α V β 3 Integrin to Differentiate between Fibronectin and High-Affinity Ligands Introduction : Results :"
- Badea, Madalina Andreea, Mihaela Balas, Anca Hermenean, Alina Ciceu, Hildegard Herman, Daniela Ionita, and Anca Dinischiotu. 2019. "Influence of Matrigel on Single- and Multiple-Spheroid Cultures in Breast Cancer Research." *SLAS Discovery* 24(5):563–78.
- Bae, Hong Beom, Jaroslaw W. Zmijewski, Jessy S. Deshane, Degui Zhi, Lawrence C. Thompson, Cynthia B. Peterson, David D. Chaplin, and Edward Abraham. 2012. "Vitronectin Inhibits Neutrophil Apoptosis through Activation of Integrin-Associated Signaling Pathways." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 46(6):790–96.
- Barczyk, Malgorzata, Sergio Carracedo, and Donald Gullberg. 2010. "Integrins." *Cell and Tissue Research* 339(1):269–80.
- Ben-mabrouk, Hazem, Raoudha Zouari-kessentini, and Fadoua Montassar. 2016. "International Journal of Biological Macromolecules CC5 and CC8 , Two Homologous Disintegrins from Cerastes Cerastes Venom , Inhibit in Vitro and Ex Vivo Angiogenesis." *International Journal of Biological Macromolecules* 86:670–80.
- Bertout, Jessica A., Shetal A. Patel, and M. Celeste Simon. 2008. "The Impact of O₂ Availability on Human Cancer." *Nature Reviews. Cancer* 8(12):967–75.
- Bissell, Mina J; et al. 2002. "Beta 4 Integrin-Dependent Formation of Polarized Three- Dimensional Architecture Confers Resistance to Apoptosis in Normal and Malignant Mammary Epithelium." *Cancer Cell* 2(September):205–16.
- Breslin, Susan and Lorraine O. Driscoll. 2013. "Three-Dimensional Cell Culture : The Missing Link in Drug Discovery." *Drug Discovery Today* 18(5–6):240–49.
- Bridgewater, Rebecca E., Jim C. Norman, and Patrick T. Caswell. 2012. "Integrin Trafficking at a Glance." *Journal of Cell Science* 125(16):3695–3701.
- Brooks, Danielle L. Peacock, Luciana P. Schwab, Raisa Krutilina, Deanna N. Parke, Aarti Sethuraman, David Hoogewijs, Alexandra Schörg, Lauren Gotwald, Meiyun Fan, Roland H. Wenger, and

- Tiffany N. Seagroves. 2016. "ITGA6 Is Directly Regulated by Hypoxia-Inducible Factors and Enriches for Cancer Stem Cell Activity and Invasion in Metastatic Breast Cancer Models." *Molecular Cancer* 15(1):26.
- Burroughs, Sarah K., Stefan Kaluz, Danzhu Wang, Ke Wang, Erwin G. Van Meir, and Binghe Wang. 2014 Hypoxia inducible factor pathway inhibitors as anticancer therapeutics. *Future Med Chem.*, 5(5):1–31.
- Calvete, Juan J. 2013. "Toxicon The Continuing Saga of Snake Venom Disintegrins." *Toxicon* 62:40–49.
- Carey, Shawn P., Karen E. Martin, and Cynthia A. Reinhart-king. 2017. "Three-Dimensional Collagen Matrix Induces a Mechanosensitive Invasive Epithelial Phenotype." *Nature Publishing Group* (August 2016):1–14.
- Casali, Bruna C., Larissa T. Gozzer, Matheus P. Baptista, Wanessa F. Altei, and Heloisa S. Selistre-de-araújo. 2022. "The Effects of Av β 3 Integrin Blockage in Breast Tumor and Endothelial Cells under Hypoxia In Vitro." *International Journal of M* 23:1–17.
- Cassini-Vieira, Puebla, Simone R. amos Deconte, Tatiana C. arla Tomiosso, Paula P. eixoto Campos, Cyntia de Freitas Montenegro, Heloisa S. obreiro Selistre-de-Araújo, Lucíola Silva Barcelos, Silvia P. assos Andrade, and Fernanda de Assis Araújo. 2014. "DisBa-01 Inhibits Angiogenesis, Inflammation and Fibrogenesis of Sponge-Induced-Fibrovascular Tissue in Mice." *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology* 92:81–89.
- Caswell, Patrick T., May Chan, Andrew J. Lindsay, Mary W. McCaffrey, David Boettiger, and Jim C. Norman. 2008. "Rab-Coupling Protein Coordinates Recycling of A5 β 1 Integrin and EGFR1 to Promote Cell Migration in 3D Microenvironments." *Journal of Cell Biology* 183(1):143–55.
- Caswell, Patrick T., Suryakiran Vadrevu, and Jim C. Norman. 2009. "Integrins: Masters and Slaves of Endocytic Transport." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10(12):843–53.
- Caswell, Patrick T., May Chan, Andrew J. Lindsay, Mary W. McCaffrey, David Boettiger, and Jim C. Norman. 2008. "Rab-Coupling Protein Coordinates Recycling of A5 β 1 Integrin and EGFR1 to Promote Cell Migration in 3D Microenvironments." *Journal of Cell Biology* 183(1):143–55.
- Chang, Howard Y., Julie B. Sneddon, Ash A. Alizadeh, Ruchira Sood, Rob B. West, Kelli Montgomery, Jen-tsan Chi, Matt Van De Rijn, David Botstein, and Patrick O. Brown. 2004. "Gene Expression Signature of Fibroblast Serum Response Predicts Human Cancer Progression : Similarities between Tumors and Wounds." 2(2):206–14.
- Chaturvedi, Pallavi, Andre Levchenko, Gregg L. Semenza, Pallavi Chaturvedi, Daniele M. Gilkes, Carmen Chak, and Lui Wong. 2013. "Hypoxia-Inducible Factor – Dependent Breast Cancer – Mesenchymal Stem Cell Bidirectional Signaling Promotes Metastasis Find the Latest Version : Hypoxia-Inducible Factor – Dependent Breast Cancer – Mesenchymal Stem Cell Bidirectional Signaling Promotes Me." (March).
- Choi, Jae Young, Yeon Soo Jang, Sun Young Min, and Jeong Yoon Song. 2011. "Overexpression of MMP-9 and Hif-1 α in Breast Cancer Cells under Hypoxic Conditions." *Journal of Breast Cancer* 14(2):88–95.

- Chung, J. 2004. "Hypoxia-Induced Vascular Endothelial Growth Factor Transcription and Protection from Apoptosis Are Dependent on $\alpha 6 \beta 1$ Integrin in Breast Carcinoma Cells." *Cancer Research* 64(617):4711–16.
- Clapp, Carmen, Stephanie Thebault, Michael C. Jeziorski, and Gonzalo Martinez De La Escalera. 2009. "Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis." *Physiological Reviews* 89(4):1177–1215.
- Crotalus, Rattlesnake, Elda E. Sánchez, Sara E. Lucena, Steven Reyes, Julio G. Soto, Esteban Cantu, Carlos Lopez-johnston, Belsy Guerrero, Ana Maria Salazar, Alexis Rodríguez-acosta, Jacob A. Galán, W. Andy Tao, and John C. Pérez. 2012. "NIH Public Access." 126(3).
- Dahl, Karen D. Cowden, Sarah E. Robertson, Valerie M. Weaver, M. Celeste Simon, and X. Hif. 2005. "Hypoxia-Inducible Factor Regulates $\alpha v \beta 3$ Integrin Cell Surface Expression." 16(April):1901–12.
- Dai, Xiaofeng, Hongye Cheng, Zhonghu Bai, and Jia Li. 2017. "Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping." *Journal of Cancer* 8:3131–41.
- Danen, Erik H. J., Jacco Van Rheenen, Willeke Franken, Stephan Huveneers, Petra Sonneveld, Kees Jalink, and Arnoud Sonnenberg. 2005. "Integrins Control Motile Strategy through a Rho-Cofilin Pathway." *Journal of Cell Biology* 169(3):515–26.
- Danilucci, Taís M., Patty K. Santos, Bianca C. Pachane, Graziéle F. D. Pisani, Rafael L. B. Lino, Bruna C. Casali, Wanessa F. Altei, and Heloisa S. Selistre-De-Araujo. 2019. "Recombinant RGD-Disintegrin DisBa-01 Blocks Integrin $\alpha v \beta 3$ and Impairs VEGF Signaling in Endothelial Cells." *Cell Communication and Signaling* 17(1):1–15.
- Das, Vishal, Gazal Kalyan, Saugata Hazra, and Mintu Pal. 2017. "Understanding the Role of Structural Integrity and Differential Expression of Integrin Profiling to Identify Potential Therapeutic Targets in Breast Cancer." *Journal of Cellular Physiology* (January 2017).
- De, Universidade Federal, Carlos Campus, Carlos Programa Interinstitucional De, E. M. Ci, Ncias Fisiol, Gicas Pípgcf Ufscar, Unesp Ta, and Marolato Danilucci. 2018. "Inibição Do Cross-Talk Entre Alfa (α) Beta (β) e VEGFR2 Na Angiogênese Pela Desintegrina Dis Ba -01." (v):1–92.
- Dunn, Lauren K., Khalid S. Mohammad, Pierrick G. J. Fournier, C. Ryan McKenna, Holly W. Davis, Maria Niewolna, Xiang Hong Peng, John M. Chirgwin, and Theresa A. Guise. 2009. "Hypoxia and TGF- β Drive Breast Cancer Bone Metastases through Parallel Signaling Pathways in Tumor Cells and the Bone Microenvironment." *PLoS ONE* 4(9).
- Fox, Jay W. and Solange M. T. Serrano. 2008. "Insights into and Speculations about Snake Venom Metalloproteinase (SVMP) Synthesis, Folding and Disulfide Bond Formation and Their Contribution to Venom Complexity." *FEBS Journal* 275(12):3016–30.
- Friess, Helmut, Jan M. Langrehr, Helmut Oettle, Jochen Raedle, Marco Niedergethmann, Christian Dittrich, Dieter K. Hossfeld, Herbert Stöger, Bart Neyns, Peter Herzog, Pascal Piedbois, Frank Dobrowolski, Werner Scheithauer, Robert Hawkins, Frieder Katz, Peter Balcke, Jan Vermorken, Simon van Belle, Neville Davidson, Albert Abad Esteve, Daniel Castellano, Jörg Kleeff, Adrien a Tempia-Caliera, Andreas Kovar, and Johannes Nippgen. 2006. "A Randomized Multi-Center Phase II Trial of the Angiogenesis Inhibitor Cilengitide (EMD 121974) and Gemcitabine

Compared with Gemcitabine Alone in Advanced Unresectable Pancreatic Cancer.” *BMC Cancer* 6(December):285.

- Froehlich, Karolin, Jan-dirk Haeger, Julia Heger, Jana Pastuschek, Stella Mary Photini, Yan Yan, Amelie Lupp, Christiane Pfarrer, Ralf Mrowka, Ekkehard Schleußner, Udo R. Markert, and André Schmidt. 2016. “Generation of Multicellular Breast Cancer Tumor Spheroids : Comparison of Different Protocols.” *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*.
- Garcia, Elizabeth, Ismat Luna, Kaya L. Persad, Kate Agopsowicz, David A. Jay, Frederick G. West, Mary M. Hitt, and Sujata Persad. 2021. “Inhibition of Triple Negative Breast Cancer Metastasis and Invasiveness by Novel Drugs That Target Epithelial to Mesenchymal Transition.” *Scientific Reports* 11:1–15.
- Gilkes, Daniele M., Gregg L. Semenza, and Denis Wirtz. 2014. “Hypoxia and the Extracellular Matrix: Drivers of Tumour Metastasis.” *Nature Reviews. Cancer* 14(6):430–39.
- Guo, Wenjun and Filippo G. Giancotti. 2004. “Integrin Signalling during Tumour Progression.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5(10):816–26.
- Haddad, Tufia; Qin, Rui; Satele, Daniele, Matteuw, Eadens; Matteus, Goetz; Erlichmn, Charles; Molina, Julian. 1999. “A Phase I and Pharmacokinetic Study of Losoxantrone and Paclitaxel in Patients with Advanced Solid Tumors.” *Clinical Cancer Research* 5(2):299–308.
- Hariharan, S., D. Gustafson, S. Holden, D. McConkey, D. Davis, M. Morrow, M. Basche, L. Gore, C. Zang, C. L. O’Byrant, a Baron, D. Gallemann, D. Colevas, and S. G. Eckhardt. 2007. “Assessment of the Biological and Pharmacological Effects of the Alpha Nu Beta3 and Alpha Nu Beta5 Integrin Receptor Antagonist, Cilengitide (EMD 121974), in Patients with Advanced Solid Tumors.” *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 18(8):1400–1407.
- Harisi, Revekka and Andras Jeney. 2015. “Extracellular Matrix as Target for Antitumor Therapy.” *OncoTargets and Therapy* 8:1387–98.
- He, Lin, Yang Lv, Yuhua Song, and Biyuan Zhang. 2019. “The Prognosis Comparison of Different Molecular Subtypes of Breast Tumors after Radiotherapy and the Intrinsic Reasons for Their Distinct Radiosensitivity.” *Cancer Management and Research* 11:5765–75.
- Hickman, John A., Ralph Graeser, Ronald De Hoogt, Suzana Vidic, Catarina Brito, Matthias Gutekunst, and Heiko Van Der Kuip. 2014. “Three-Dimensional Models of Cancer for Pharmacology and Cancer Cell Biology : Capturing Tumor Complexity in Vitro / Ex Vivo.” 1115–28.
- Hielscher, Abigail, Kim Ellis, Connie Qiu, Josh Porterfield, and Sharon Gerech. 2016. “Fibronectin Deposition Participates in Extracellular Matrix Assembly and Vascular Morphogenesis.” *PLoS ONE* 11(1):1–27.
- Huveneers, Stephan and Erik H. J. Danen. 2009. “Adhesion Signaling - Crosstalk between Integrins, Src and Rho.” *Journal of Cell Science* 122:1059–69.
- Hwang, Heeyoun, Ju Yeon Lee, Hyun Kyoung Lee, Gun Wook Park, Hoi Keun Jeong, Myeong Hee Moon, Jin Young Kim, and Jong Shin Yoo. 2014. “In-Depth Analysis of Site-Specific N-

Glycosylation in Vitronectin from Human Plasma by Tandem Mass Spectrometry with Immunoprecipitation.” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406(30):7999–8011.

Joyce, Johana; and Jeffrey Pollard. 2012. “NIH Public Access.” 76(October 2009):211–20.

Ju, Julia A., Inês Godet, I. Chae Ye, Jungmin Byun, Hasini Jayatilaka, Sun Joo Lee, Lisha Xiang, Debangshu Samanta, Meng Horng Lee, Pei-Hsun Wu, Denis Wirtz, Gregg L. Semenza, and Daniele M. Gilkes. 2017. “Hypoxia Selectively Enhances Integrin $\alpha 5 \beta 1$ Receptor Expression in Breast Cancer to Promote Metastasis.” *Molecular Cancer Research* 15(6):723–34.

Kauskot, Alexandre ; Cominetti, Marcia R; Ramos, Oscar HP; Bechyne, Iga; Renard, Jean-Marie; Hoylaerts, Marc F; Crepin, Michel; Legrand, Chantal ; Selistre-de-Araujo, Heloisa S; Bonnefoy, Arnoud. 2008. “Anti-Hemostatic Effects of Disba-01 Hemostatic Effects of Recombinant DisBa-01, a Disintegrin From.” *Blood* 12(3).

Khan, Mohammad Imran, Suvasmita Rath, Vaqar Mustafa Adhami, and Hasan Mukhtar. 2017. “Hypoxia Driven Glycation: Mechanisms and Therapeutic Opportunities.” *Seminars in Cancer Biology*.

Korkaya, Hasan, Suling Liu, and Max S. Wicha. 2011. “Review Series Breast Cancer Stem Cells , Cytokine Networks , and the Tumor Microenvironment.” *The Journal of Clinical Investigation* 121(10):3804–9.

Kumra, Heena and Dieter P. Reinhardt. 2016. “Fibronectin-Targeted Drug Delivery in Cancer.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 97:101–10.

Li, Jihong, Yoshiyuki Fukase, Yi Shang, Wei Zou, José M. Muñoz-Félix, Lorena Buitrago, Johannes van Agthoven, Yixiao Zhang, Ryoma Hara, Yuta Tanaka, Rei Okamoto, Takeshi Yasui, Takashi Nakahata, Toshihiro Imaeda, Kazuyoshi Aso, Yuchen Zhou, Charles Locuson, Dragana Nesic, Mark Duggan, Junichi Takagi, Roger D. Vaughan, Thomas Walz, Kairbaan Hodivala-Dilke, Steven L. Teitelbaum, M. Amin Arnaut, Marta Filizola, Michael A. Foley, and Barry S. Collier. 2019. “Novel Pure AV β 3 Integrin Antagonists That Do Not Induce Receptor Extension, Prime the Receptor, or Enhance Angiogenesis at Low Concentrations.” *ACS Pharmacology & Translational Science* 2(6):387–401.

Lino, Rafael, Patty K. Santos, Fernanda Deriggi Pisani, Wanessa Fernanda Altei, and Marcia Cominetti. 2019. “Alphavbeta3 Integrin Blocking Inhibits Apoptosis and Induces Autophagy in Murine Breast Tumor Cells.” *BBA - Molecular Cell Research* 118536.

Lino, Rafael, Patty Santos, Fernanda Deriggi Pisani, Wanessa Fernanda Altei, Marcia Cominetti, and Heloisa Selistre-de-Araújo. 2019. “Jo Ur Na l P Of.” *BBA - Molecular Cell Research* 118536.

Lombardi, Giuseppe, Ardi Pambuku, Luisa Bellu, Miriam Farina, Alessandro Della Puppa, Luca Denaro, and Vittorina Zagonel. 2017. “Effectiveness of Antiangiogenic Drugs in Glioblastoma Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials.” *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 111:94–102.

Lv, Donglai, Shi-cang Yu, Yi-fang Ping, Haibo Wu, and Xilong Zhao. 2016. “A Three-Dimensional Collagen Scaffold Cell Culture System for Screening Anti-Glioma Therapeutics.” *Oncotarget* 7(35).

- Macêdo, Jéssica Kele Arruda, Jay W. Fox, Mariana De Souza Castro, Jéssica Kele, Arruda Macêdo, Jay W. Fox, and Mariana De Souza Castro. 2015. "Disintegrins from Snake Venoms and Their Applications in Cancer Research and Therapy." *Current Protein and Peptide Science* 16(6):532–48.
- Mas-Moruno, Carlos, Florian Rechenmacher, and Horst Kessler. 2011. "Cilengitide: The First Anti-Angiogenic Small Molecule Drug Candidate. Design, Synthesis and Clinical Evaluation." *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*.
- Micocci, et al. 2016. "Biochimie ADAM9 Silencing Inhibits Breast Tumor Cells Transmigration through Blood and Lymphatic Endothelial Cells." 129:174–82.
- Momic T, Katzehandler J, Benny F. 2014. "Vimocin and Vidapin, Cyclic KTS Peptides, Are Dual Antagonists of A1b1/A2b1 Integrins with Antiangiogenic Activity." 1–22.
- Montenegro, Cyntia F., Bruna C. Casali, Rafael L. B. Lino, Bianca C. Pachane, Patty K. Santos, Alan R. Horwitz, Heloisa S. Selistre-De-Araujo, and Marcelo L. Lamers. 2017. "Inhibition of Av β 3 Integrin Induces Loss of Cell Directionality of Oral Squamous Carcinoma Cells (OSCC)." *PLoS ONE* 12(4):1–14.
- Montenegro, Cyntia F., Carmen L. Salla-Pontes, Juliana U. Ribeiro, Aline Z. MacHado, Rafael F. Ramos, Camila C. Figueiredo, Verônica Morandi, and Heloisa S. Selistre-De-Araujo. 2012. "Blocking Av β 3 Integrin by a Recombinant RGD Disintegrin Impairs VEGF Signaling in Endothelial Cells." *Biochimie* 94(8):1812–20.
- Moritz, De Oliveira, Bruna Carla Casali, Uliana Sbeguen Stotzer, Patty Karina, and Heloisa Sobreiro Selistre-de-araujo. 2022. "Alternagin-C, an Alpha2beta1 Integrin Ligand, Attenuates Collagen-Based Adhesion, Stimulating the Metastasis Suppressor 1 Expression in Triple-Negative Breast Tumor Cells." *Toxicon* 210(January):1–10.
- Muñoz-Nájar, U. M., K. M. Neurath, F. Vumbaca, and K. P. Claffey. 2006. "Hypoxia Stimulates Breast Carcinoma Cell Invasion through MT1-MMP and MMP-2 Activation." *Oncogene* 25(16):2379–92.
- Napolitano, Anthony P., Dylan M. Dean, Alan J. Man, Jacquelyn Youssef, Don N. Ho, Adam P. Rago, Matthew P. Lech, and Jeffrey R. Morgan. 2007. "Short Technical Reports Scaffold-Free Three-Dimensional Cell Culture Utilizing Micromolded Nonadhesive Hydrogels."
- Nath, Sritama; Devi, Gayathri. 2017. "Three-Dimensional Culture Systems in Cancer Research: Focus on Tumor Spheroid Model." *Pharmacol Ther.* 163:94–108.
- Orlando, Robert A. and David A. Cheresh. 1991. "Arginine-Glycine-Aspartic Acid Binding Leading to Molecular Stabilization between Integrin and Its Ligand *." *Journal of Biological Chemistry* 266(29):19543–50.
- Osinsky, S., M. Zavelevich, and P. Vaupel. 2009. "Tumor Hypoxia and Malignant Progression." *Experimental Oncology* 31(2):80–86.
- Parisi, Ludovica, Andrea Toffoli, Benedetta Ghezzi, Beatrice Mozzoni, Simone Lumetti, and Guido M. Macaluso. 2020. "A Glance on the Role of Fibronectin in Controlling Cell Response at Biomaterial

Interface.” *Japanese Dental Science Review* 56(1):50–55.

- Paszek, Matthew J., Nastaran Zahir, Kandice R. Johnson, Johnathon N. Lakins, Gabriela I. Rozenberg, Amit Gefen, Cynthia A. Reinhart-King, Susan S. Margulies, Micah Dembo, David Boettiger, Daniel A. Hammer, and Valerie M. Weaver. 2005. “Tensional Homeostasis and the Malignant Phenotype.” *Cancer Cell* 8(3):241–54.
- Pellinen, Teijo and Johanna Ivaska. 2006. “Integrin Traffic.” *Journal of Cell Science* 119(18):3723–31.
- Petrova, Varvara, Margherita Annicchiarico-petruzzelli, Gerry Melino, and Ivano Amelio. 2018. “The Hypoxic Tumour Microenvironment.” *Oncogenesis*.
- Pia Nyberg, Tuula Salo and Raghu Kalluri. 2008. “Tumor Microenvironment and Angiogenesis.” [*Frontiers in Bioscience* 13(1):6537–53.
- Provenzano, Paolo P. and Patricia J. Keely. 2009. “The Role of Focal Adhesion Kinase in Tumor Initiation and Progression.” (December):347–50.
- Rahimi, N. 2012. “The Ubiquitin-Proteasome System Meets Angiogenesis.” *Molecular Cancer Therapeutics* 11(3):538–48.
- Ramachandran, Shaliny, Jonathan Ient, Eva Leonne Göttgen, Adam J. Krieg, and Ester M. Hammond. 2015. “Epigenetic Therapy for Solid Tumors: Highlighting the Impact of Tumor Hypoxia.” *Genes* 6(4):935–56.
- Ramos, Carla J., Daniel A. Gutierrez, Ana S. Aranda, Melissa A. Koshlaychuk, David A. Carrillo, Rafael Medrano, Terri D. McBride, U. Andrew, Stephanie M. Medina, Melissa C. Lombardo, Sara E. Lucena, Elda E. Sanchez, and Julio G. Soto. 2016. “Toxicon Functional Characterization of Six Aspartate (D) Recombinant Mojastin Mutants (r-Moj): A Second Aspartate Amino Acid Carboxyl to the RGD in r-Moj-D _ Peptides Is Not Suf Fi Cient to Induce Apoptosis of SK-Mel-.” *Toxicon* 118:36–42.
- Ramos, Oscar H. P., Alexandre Kauskot, Márcia R. Cominetti, Iga Bechyne, Carmen L. Salla Pontes, Fabrice Chareyre, Jan Manent, Roger Vassy, Marco Giovannini, Chantal Legrand, Heloisa S. Selistre-De-Araujo, Michel Crépin, and Arnaud Bonnefoy. 2008. “A Novel Avβ3-Blocking Disintegrin Containing the RGD Motive, DisBa-01, Inhibits BFGF-Induced Angiogenesis and Melanoma Metastasis.” *Clinical and Experimental Metastasis* 25(1):53–64.
- Reymond, Nicolas, Bárbara Borda D’Água, and Anne J. Ridley. 2013. “Crossing the Endothelial Barrier during Metastasis.” *Nature Reviews. Cancer* 13(12):858–70.
- Reynolds, Andrew R., Ian R. Hart, Alan R. Watson, Jonathan C. Welti, Rita G. Silva, Stephen D. Robinson, Georges Da Violante, Morgane Gourlaouen, Mishal Salih, Matt C. Jones, Dylan T. Jones, Garry Saunders, Vassiliki Kostourou, Françoise Perron-Sierra, Jim C. Norman, Gordon C. Tucker, and Kairbaan M. Hodivala-Dilke. 2009. “Stimulation of Tumor Growth and Angiogenesis by Low Concentrations of RGD-Mimetic Integrin Inhibitors.” *Nature Medicine* 15(4):392–400.
- Schneider, Caroline A., Wayne S. Rasband, Kevin W. Eliceiri, and Computational Instrumentation. 2017. “NIH Image to ImageJ : 25 Years of Image Analysis.” 9(7):671–75.

- Schultz, Gregory S. and Annette Wysocki. 2009. "Interactions between Extracellular Matrix and Growth Factors in Wound Healing." *Wound Repair and Regeneration* 17(2):153–62.
- Selistre-de-Araujo, Heloisa S., Carmen L. S. Pontes, Cyntia F. Montenegro, and Ana Carolina B. M. Martin. 2010. "Snake Venom Disintegrins and Cell Migration." *Toxins* 2(11):2606–21.
- Shattil S F, Kim C, and Ginsberg M H. 2010. "The Final Steps of Integrin Activation: The End Game Sanford." 27(3):320–31.
- Shoval, Hila, Adi Karsch-bluman, Yifat Brill-karniely, Tal Stern, Gideon Zamir, and Ofra Benny. 2017. "Tumor Cells and Their Crosstalk with Endothelial Cells in 3D Spheroids." *Scientific Reports* 1–11.
- Sorg, Brian S., North Carolina, Matthew E. Hardee, Benjamin J. Moeller, and Mark W. Dewhirst. 2021. "Spectral Imaging Facilitates Visualization and Measurements of Unstable and Abnormal Microvascular Oxygen Transport in Tumors." 13(February 2008):1–11.
- Stadler et al. 2015. "Ac Ce Pt e d Us Ip T." *Seminars in Cancer Biology*.
- Stuart, Mellannie P., Renata A. M. Matsui, Matheus F. S. Santos, Isis Côrtes, Mayra S. Azevedo, Karina R. Silva, Anderson Beatrice, Paulo Emílio C. Leite, Priscila Falagan-lotsch, José M. Granjeiro, Vladimir Mironov, and Leandra S. Baptista. 2017. "Successful Low-Cost Scaffold-Free Cartilage Tissue Engineering Using Human Cartilage Progenitor Cell Spheroids Formed by Micromolded Nonadhesive Hydrogel." 2017.
- Sung, Hyuna, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jemal, and Freddie Bray. 2021. "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 0(0):1–41.
- Wang, Karin, Bo Ri Seo, Claudia Fischbach, and Delphine Gourdon. 2016. "Fibronectin Mechanobiology Regulates Tumorigenesis." *Cellular and Molecular Bioengineering* 9(1):1–11.
- White, Dominic P., Patrick T. Caswell, and Jim C. Norman. 2007. "Av β 3 and A5 β 1 Integrin Recycling Pathways Dictate Downstream Rho Kinase Signaling to Regulate Persistent Cell Migration." *Journal of Cell Biology* 177(3):515–25.
- Zeltz, Cédric, Joseph Orgel, and Donald Gullberg. 2014. "Molecular Composition and Function of Integrin-Based Collagen Glues — Introducing COLINBRIs *Biochimica et Biophysica Acta* Molecular Composition and Function of Integrin-Based Collagen Glues — Introducing COLINBRIs ☆." *Biochimica et Biophysica Acta* 1840(8):2533–48.
- Zhao, Yujie and Alex A. Adjei. 2015. "Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor." *The Oncologist* 20(6):660–73.
- Zollinger, Alicia J. and Michael L. Smith. 2017. "Fibronectin, the Extracellular Glue." *Matrix Biology* 60–61:27–37.

CAPÍTULO III: Consequências do bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ no compacto agregado da célula MDA-MB-231 e no esferóide da HUVEC com o tratamento da DisBa-01 em normóxia e hipóxia

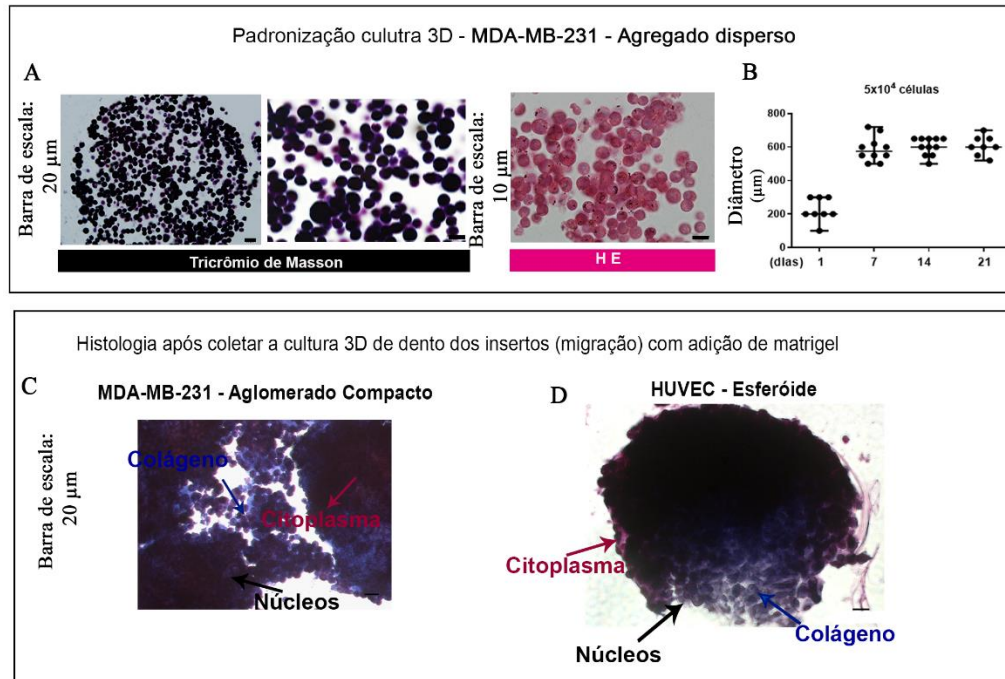
III-A) RESULTADOS

Após a formação da cultura 3D em micromolde não adesivo, tentou-se retirar a cultura 3D por jatos de PBS, mas as células MDA-MB-231 não se mantiveram compactas. Então as células provenientes da cultura 3D foram fixadas no micromolde não adesivo, seguida de sanduiche entre agaroses, cuja mantém a solidificação em altas temperaturas, para análise histológica. Foram feitas duas colorações na cultura 3D, Tricrômico de Masson e H&E, para observar a matriz extracelular (MEC), como o colágeno.

A cultura celular 3D proveniente das células MDA-MB-231 não secretam matriz extracelular suficiente para observar colágeno, mostrada em ambas colorações, compreendendo que ocorre uma formação de aglomerado de células dispersas circular, mesmo mantendo o diâmetro em torno de 600 μm por 7 e 21 dias (Fig. 12 A-B)

Dessa forma foi observado que as células MDA-MB-231 necessitam de uma membrana basal para ocorrer a automontagem, então acrescentou-se 7% de matrigel GFR no meio base para a formação do aglomerado compacto da cultura 3D das células MDA-MB-231 e formação de esferóide para a HUVEC (Fig. 12 C-D). Assim foi possível retirar do micromolde de ambas culturas 3D no 7º dia para testar a migração celular em câmara de Boyden.

Figura 12: Aglomerado disperso x aglomerado compacto da célula MDA-MB-231 e esferoide da HUVEC. A-B) Padronização da cultura 3D. C-D) Padronização da histologia do compacto agregado e esferoide em lâmina silanizada.

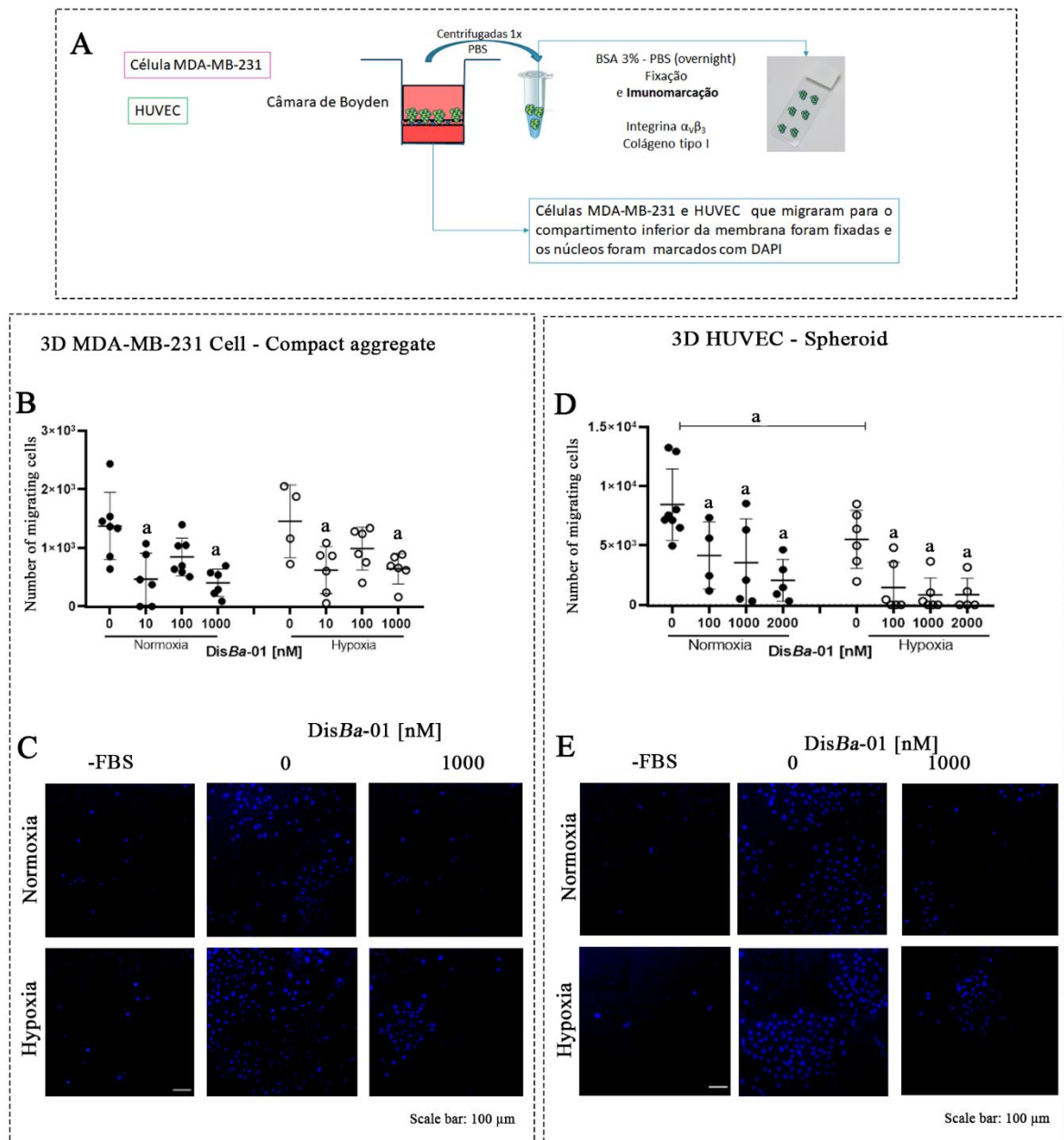


Foi estabelecido 5×10^5 das células MDA-MB-231 por 7 dias com um diâmetro final em torno de 500 µm. Para a cultura 3D das HUVECs, o cultivo inicial foi de 1×10^6 células por 7 dias com um diâmetro final em torno de 400 µm.

Após a retirada dos compactos agregados e esferóides no micromolde de agarose, as culturas 3D foram tratadas com a DisBa-01 por 30 minutos em temperatura ambiente, seguida da transferência para o inserto da câmara de Boyden. Após 24h, os compactos agregados e os esferóides foram coletados de dentro dos inserts para imunomarcagem e as células que migraram no compartimento inferior na membrana do inserto foram analisadas (Fig. 13 A).

A migração das células MDA-MB-231 foram inibidas pelo tratamento com 10 e 1000 nM da DisBa-01 em ambas as condições de oxigenação, porém não houve inibição em 100 nM (Fig. 13 B-C). A migração de HUVECs foram inibidas a partir de 100 nM da DisBa-01 em ambas as condições de oxigenação. Houve um aumento de migração das células provenientes dos esferóides não tratadas com a DisBa-01 em normóxia em relação a hipóxia (Fig. 13 C-D).

Figura 13: Análise dos compactos agregados e esferóides A) Esquema mostrando os compactos agregados e os esferóides transferidos na câmara de Boyden, com as células migrantes representadas como esferas azuis, seguida da fixação dos núcleos na membranda do inserto e imunomarcção. B-C) Inibição da migração das células MDA-MB-231 proveniente dos compactos agregados pelo tratamento com a DisBa-01 em normóxia e hipóxia. D-E) Inibição da migração de HUVECs proveniente dos esferóides pelo tratamento com a DisBa-01 em normóxia e hipóxia. Os resultados da inibição da migração (média \pm DP) foram comparados usando ANOVA two-way com pós teste de Tukey ($p < 0,05$ em três inventosdependentes ($n = 3$) em duplicata. A letra “a” dos gráficos representam as comparações das células não tratadas com as células tratadas com a DisBa-01 e também as células não tratadas em normóxia e hipóxia.



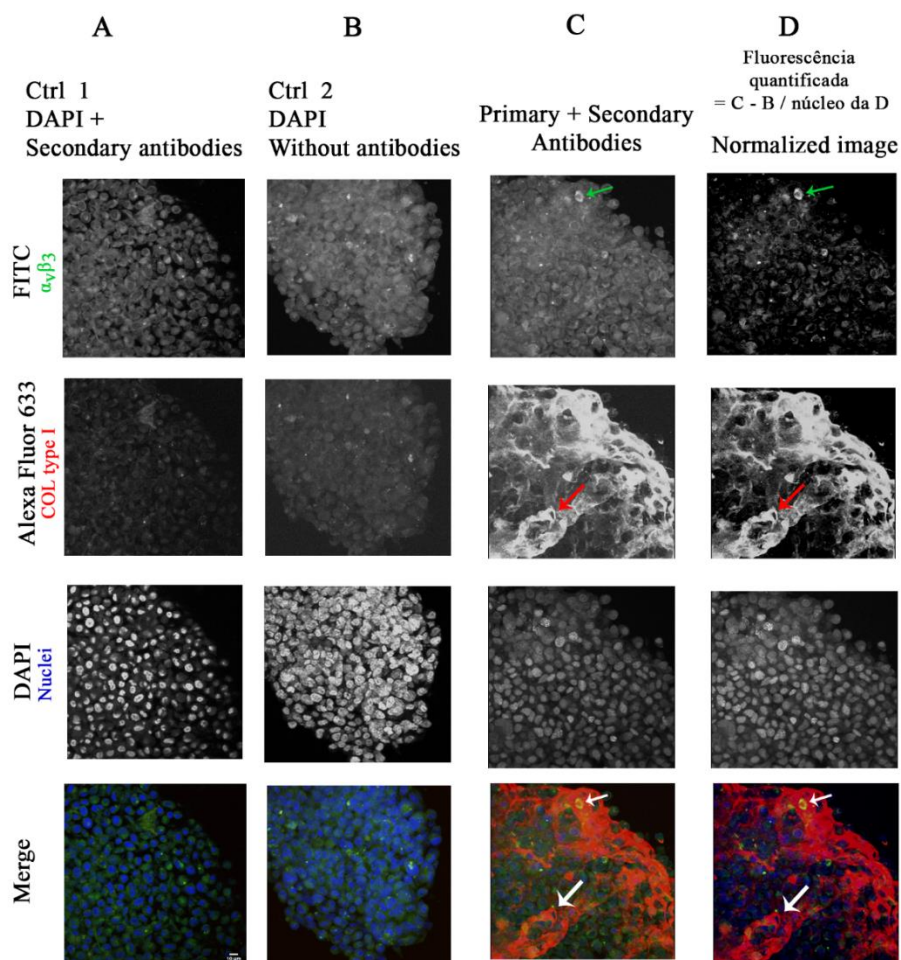
Foram feitos controles para imunomarcção dos compactos agregados e os esferóides. A figura 14 mostra os controles dos compactos agregado. Podemos observar dois controles (Fig. 14, coluna A-B), mais a imagem bruta que será explicado em detalhes (Fig. 14, coluna C), assim como a imagem editada para análise (Fig. 14, coluna D).

Foram adicionados apenas os anticorpos secundários *anti-mouse-FITC* e *anti-rabbit-633* para observar uma possível interação inespecífica, no controle 1, coluna A, representados na primeira e segunda fileira, integrina $\alpha_v\beta_3$ e colágeno tipo I, respectivamente. Mesmo sem os anticorpos primários, observamos fluorescência verde e baixa fluorescência vermelha, observada principalmente na captura das imagens pelo microscópio confocal. Nos questionamos se realmente era interação inespecífica ou uma auto-fluorescência, então foi feito o controle 2, coluna B, sem adição de anticorpos e mesmo assim as fluorescências foram observadas da mesma forma que o controle 1. Assim inferimos que a cultura 3D da célula MDA-MB-231 emite auto-fluorescência, principalmente verde.

Para quantificarmos as fluorescências (Fig. 14), foi feito uma subtração das imagens da coluna C menos as imagens da coluna A (anticorpo secundário) e B (auto-fluorescência), que resultou a coluna D dividido pelos núcleos. Em outras palavras, o resultado da coluna D é proveniente das imagens com anticorpos primários e secundários (coluna C) menos as imagens com anticorpos secundários (coluna A) ou sem anticorpos (coluna B) dividido pelos núcleos. Assim, quantificamos a integrina $\alpha_v\beta_3$ e o colágeno tipo I para análise estatística posteriormente representados na coluna D.

Foram feitos os mesmos controles para os esferóides que apresentaram auto-fluorescência verde e baixa auto-fluorescência vermelha, assim como os compactos agregados. Desta forma, também foi feita a subtração das imagens brutas para a quantificação da integrina $\alpha_v\beta_3$ e colágeno tipo I dos esferóides.

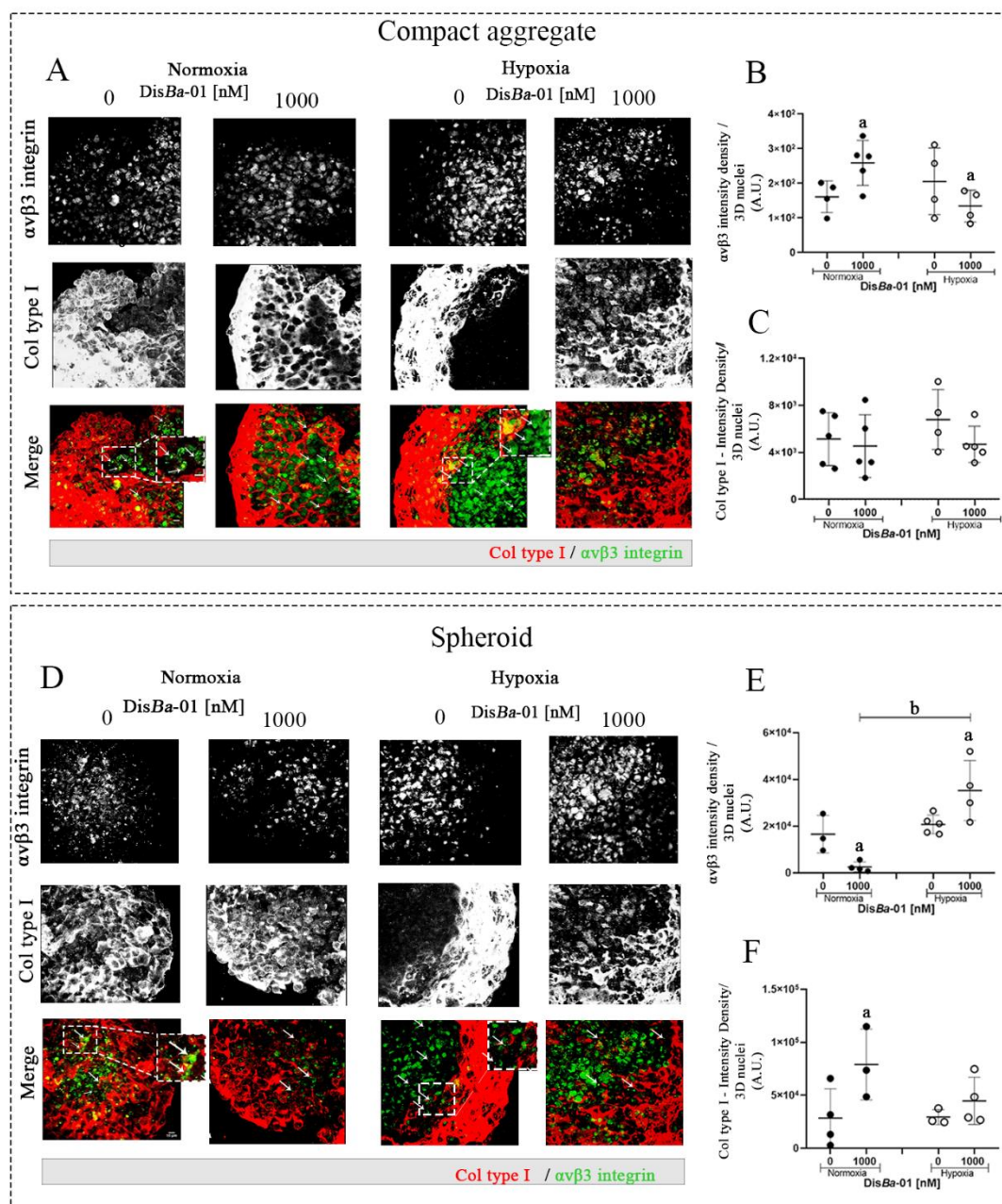
Figura 14: Análise da imunomarcação da cultura 3D de células MDA-MB-231. Foram utilizados como controle 1 (A): anticorpos secundários; para o controle 2, (B): controle sem anticorpos; (C): imunomarcação com anticorpos primários e secundários; D: imagem normalizada para quantificação



Para análise das fluorescências provenientes dos compactos agregados (Fig. 15 A), observamos que houve aumento da intensidade de fluorescência da integrina $\alpha_v\beta_3$ em normóxia e uma diminuição em hipóxia com 1000 nM da *DisBa-01* (Fig. 15 B). Porém, não houve alterações da intensidade de fluorescência do colágeno tipo I no tratamento da *DisBa-01* em normóxia hipóxia (Fig. 15 C).

Para os esferoides (Fig. 15 D), observamos a diminuição na intensidade de fluorescência da integrina $\alpha_v\beta_3$ em condição de normóxia com o tratamento da *DisBa-01*, porém houve um aumento em ambiente hipóxico com o tratamento da *DisBa-01* (Fig. 15 E). A intensidade de fluorescência do colágeno tipo I aumentou com o tratamento da *DisBa-01* em normóxia, mas não em hipóxia (Fig. 15 F).

Figura 15: Fluorescências da integrina $\alpha_v\beta_3$ e do colágeno tipo I do compacto agregado e esferóide. A) Imagens da fluorescência da integrina $\alpha_v\beta_3$, do colágeno tipo I e *merge* do compacto agregado. B) Quantificação da fluorescência da integrina $\alpha_v\beta_3$, C) e do colágeno tipo I dos compactos agregados. D) Imagens da fluorescência da integrina $\alpha_v\beta_3$, do colágeno tipo I e *merge* do esferóide. E) Quantificação da fluorescência da integrina $\alpha_v\beta_3$, F) e do colágeno tipo I dos esferóides. Os grupos foram comparados usando ANOVA two-way com pós teste de Tukey ($p < 0,05$) ou Análise de variância de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn. A letra “a” dos gráficos representam as comparações das células não tratadas com as células tratadas com a DisBa-01 e também as células não tratadas em normóxia e hipóxia.



III-B) DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A MCF7, linhagem tumoral de mama positivo para os receptores ER e PR, porém negativo HER, é capaz de formar esferóides, diferentemente do que observamos para a linhagem MDA-MB-231 que apresenta negativo para ambos receptores, bem como para HER-2 e após adição de matrigel em um micromolde não adesivo forma compactos agregados. Assim compreendemos que não é apenas a origem que influencia na automontagem de cultura 3D, pois ambas são carcinoma de origem epitelial, mas também a característica celular (FROEHLICH et al. 2016).

Após a retirada da cultura 3D do micro-molde, observamos maior tendência do compacto agregado em fundir com outro, principalmente após serem alocados e retirados dos insertos para a migração em câmara de Boyden. Por outro lado, observamos uma menor tendência de fusão no caso dos esferóides e uma maior resistência por manter uma limitação ou contorno da cultura 3D, característica principal destas estruturas. Como os esferóides seguem as leis da mecânica dos fluidos, é razoável postular que a resistência dos esferóides em fundir é correlacionada com o aumento da tensão superficial que leva a uma estabilidade e maturidade celular (STUART, et al. 2017).

A câmara de Boyden é um dos métodos mais utilizados para analisar a migração ou invasão tumoral que foi adaptada para migração da cultura 3D. Esse tipo de sistema foi usado para analisar a invasão de diferentes células tumorais a partir de culturas 3D, como as linhagens de melanoma humano (A375), célula pancreática (BxPC3), HER positivo de paciente de tumor de mama (BR-58) e células de linfonodo derivado de paciente (M21) (SHOVAL, et al., 2017) (NATH, DEVI, 2017).

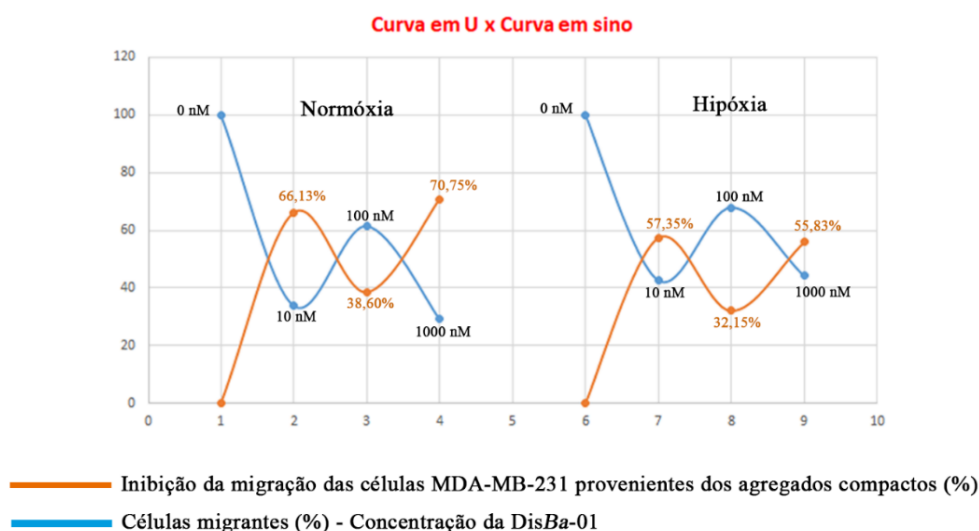
Neste trabalho, utilizamos o ensaio de migração em câmara de Boyden para avaliar o impacto da inibição da integrina $\alpha_v\beta_3$ procurando mimetizar o máximo possível a situação real de um tumor sólido, com regiões hipóxicas em seu interior. A desintegrina recombinante RGD, DisBa-01, foi utilizada como bloqueador específico para a integrina $\alpha_v\beta_3$, conforme demonstrado previamente por RAMOS et al., (2008), MONTENEGRO et al., (2017) e CASALI et al. (2022). Até o momento é a primeira vez que é utilizado esse tipo de cultivo de cultura 3D seguida de migração em câmara de Boyden com o tratamento de uma desintegrina.

Observamos a inibição da migração das células MDA-MB-231 que se destacaram dos compactos agregados tratadas com 10 e 1000 nM da DisBa-01 apresentando 66,13% e 70,75% de

inibição, exceto para 100 nM da DisBa-01 que inibiu 38,60% de células migrantes em normóxia. Ao compararmos a concentração da desintegrina RGD com a porcentagem inibitória, analisamos uma curva em sino (curva em laranja) *versus* uma curva em U (curva em azul) tanto em normóxia quanto em hipóxia. (Fig. 16). Em outras palavras, com os dados na faixa de concentração entre 10 a 1000 nM com a interação da integrina $\alpha_v\beta_3$ ocorre o efeito em U ou curva de sino para o modelo de migração em cultura 3D das células MDA-MB-231 231 em câmara de Boyden.

O conceito de dose resposta em “curva em U”, *U-shaped*, ou “curva em sino”, *bell shaped*, também chamado de hormese, é bem conhecido na biologia e medicina, não exibindo um comportamento clássico de reposta-concentração em curva-sigmoidal ou não-sigmoidal, um dos motivos por serem agonistas (OWEN et al., 2014).

Figura 16: Curva em U x Curva em sino plotado a partir da figura 13-B da inibição da migração das células MDA-MB-231 provenientes dos compactos agregados



A endostatina é um inibidor angiogênico, competidor do VEGF-C pelo VEGF-R2, que possui uma estrutura colágeno tipo XVIII que posteriormente foi adicionado o motivo RGD, Fc - IgG para aumentar a meia vida dentro do tumor e zinco para diminuir a degradação do Fc - IgG. Além disso a endostatina se liga as integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_5\beta_1$ com afinidade similar, $KD = 17.5$ nM e 18.3 nM, respectivamente (WALIA et al., 2015). Baixas e altas concentrações da endostatina apresentam uma curva denominado pelos autores “efeito bifásico” para HUVECs e também demonstraram esse efeito em alguns tipos de tumores (WALIA et al., 2015; CELIK et al., 2005).

A inibição da migração das células MDA-MB-231 em monocamada através do bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ com o tratamento da DisBa-01 apresenta em uma curva sigmoidal, diferentes da transmigração que apresenta uma curva em sino discretamente, ou seja, uma curva inibitória em U com $IC_{50} \cong 5,2$ nM em normóxia e hipóxia, além de ter demonstrado a curva em U para a inibição da migração por *Wound Healing*, (CASALI et al., 2022). Não é a primeira vez que encontramos a inibição da transmigração da célula MDA-MB-231 em curva em sino com o tratamento de uma desintegrina. Já foi observado que a transmigração da célula MDA-MB-231 com o tratamento de 40 nM com uma desintegrina símile que contém motivo adesivo ECD, denominada ALT-C, apresentou significativamente a curva em sino (MORITZ et al., 2018).

Inferimos que bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ com o tratamento da DisBa-01 em diferentes modelos celulares da célula MDA-MB-231 podem apresentar diferentes comportamentos, cultura 3D *versus* monocamada, ou seja, a curva em U *versus* curva sigmoidal (Tabela 5-A). Além disso a diferença entre de quantidade da integrina $\alpha_v\beta_3$ em cultura 3D e monocamada, também pode estar relacionado com as diferentes curvas inibitórias (Tabela 5-B).

Tabela 5: Análise da inibição da migração das células MDA-MB-231 em cultura 3D e monocama em possível “curvas em U” em 100 nM da DisBa-01. A) Modelos migratórios da célula MDA-MB-231 e B) quantificações da integrina $\alpha_v\beta_3$ e subunidade da integrina β_3 . Abreviações: norm= normóxia, hip= hipóxia.

A

Modelos migratórios em câmara de Boyden	
Compacto agregado	Célula MDA-MB-231 - monocamada
"Curva em U" em 100 nM em norm e hip	$IC_{50} = 13,43$ nM em norm $IC_{50} = 19,87$ nM em hip
Transmigração da célula MDA-MB-231	
$IC_{50} \cong 5,2$ nM em norm e hip, porém apresenta "Curva em U" em 100 nM	
Wound Healing - monocamada	
"Curva em U" em 100 nM em norm por 48h	

B

	Célula MDA-MB-231			
	integrina $\alpha_v\beta_3$		subunidade da integrina β_3	
	norm	hip	norm	hip
Monocamada analisado por citômetria de fluxo			-	+
Compacto agregado analisado por fluorescência	=	=		

Esses comportamentos biológicos migratórios apresentados podem estar relacionados com

o comportamento agonista do bloqueador da integrina $\alpha_v\beta_3$, DisBa-01 que contém alta afinidade entre ligante ($k_d = 4,63 \times 10^{-7}$ M). Além disso a DisBa-01 pode se ligar em outras proteínas (VN, FN e VEGF-R2) com menor afinidade (em μM) sendo seletivo para esses alvos secundários. Acreditamos que a DisBa-01 pode estar agindo como *SCANVAGER* na interação com a FN/VN, ou seja, sequestrando as proteínas de matriz e impedindo a interação das proteínas com a integrina $\alpha_v\beta_3$. Parte do efeito da DisBa-01 pode ser que não se liga na integrina $\alpha_v\beta_3$, mas se liga na FN e VN (*SCANVAGER*) e outra parte do efeito da desintegrina pode ser que ocorra interação integrina $\alpha_v\beta_3$ em alta afinidade competindo com o agonista endógeno FN e VN, se comportando com o efeito de agonista pleno, a qual gera o máximo de resposta durante a inibição da migração. Porém, mais investigações são necessárias para delimitar melhor esse achado (CASALI et al, Manuscrito em redação).

O bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ na inibição da migração dos esferóides foi a partir de 100 nM da DisBa-01 em normóxia e hipóxia, apresentando uma curva sigmoidal (Figura 17). Diferente da inibição da migração em HUVECs em monocamada que foi a partir de 1000 nM da DisBa-01 apenas em hipóxia por 24h, porém em 6 horas já foi observado a inibição da migração em HUVECs com o tratamento de 1000 nM da DisBa-01, principalmente com o VEGF exógeno (CASALI et al. 2022; DANILUCCI et al., 2019). Observamos as possíveis a inibição da migração de HUVECs curvas em sino em relação a concentração do bloqueador da integrina $\alpha_v\beta_3$, DisBa-01, e curva em U em relação a porcentagem inibitória em monocamada de HUVEC por *Wound Healing* e alguns parâmetros da formação de tubo das células endoteliais em matrigel GRF (CASALI et al., 2022). Esse achado também pode estar relacionado com o perfil proteínico da integrina $\alpha_v\beta_3$ em cultura 3D e monocamada. Vale ressaltar que a HUVEC apresentou maior quantidade da integrina $\alpha_v\beta_3$ e a subunidade β_3 comparada a célula MDA-MB-231 em monocamada ou cultura 3D (CASALI et al., 2022) (Tabela 6). Curiosamente, CASALI et al., (manuscrito em fase de redação) observam que a integrina $\alpha_v\beta_3$ aumentou na HUVEC em monocamada tratada com a DisBa-01 por 5 minutos, analisada também por citômetria de fluxo.

Figura 17: Curvas Sigmoidais clássicas plotadas a partir da figura 13-D da inibição da migração de HUVECs provenientes dos esferóides

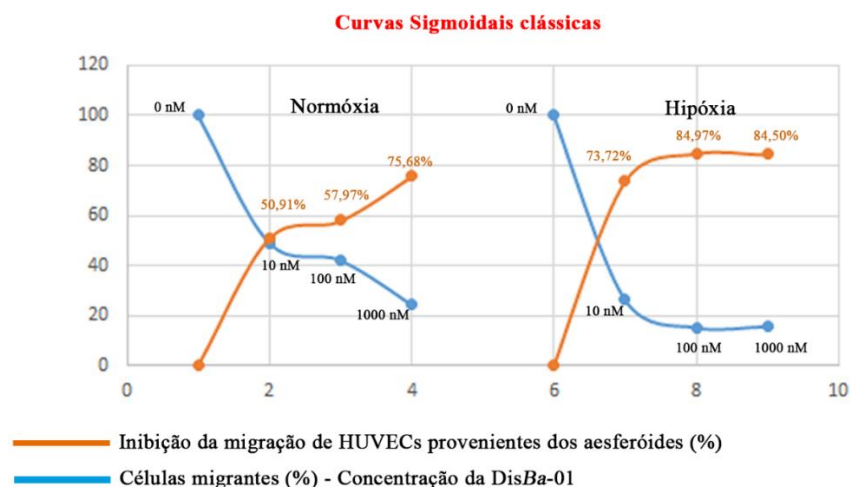


Tabela 6: Análise da inibição da migração das células de HUVECs em cultura 3D e monocama em possíveis “curvas em U” em 100 nM da DisBa-01. A) Modelos migratórios da HUVEC e B) quantificações da integrina $\alpha_v\beta_3$ e subunidade da integrina β_3 . Abreviações: norm= normóxia, hip= hipóxia.

A

Modelos migratórios em câmara de Boyden	
Esferóide	HUVECs - monocamada
Inibição a partir de 100 nM em norm e hip	Inibição a partir de 1000 nM apenas em hipóxia 1000 nM com VEGF exógeno em normóxia por 6h
Wound Healing - monocamada	Formação de tubos
"Curva em U" em 100 nM em norm por 48h	Parâmetros, <i>total lenght</i> , <i>n.of nodes</i> , apresentaram "Curva em U" em 100 nM em norm

B

	HUVEC			
	integrina $\alpha_v\beta_3$		subunidade da integrina β_3	
	norm	hip	norm	hip
Monocamada analisado por citometria de fluxo			+	-
Compacto agregado analisado por fluorescência	=	=		

*HUVECs apresentaram maior quantidade das integrinas em relação as células MDA-MB-231

Dessa forma, podemos inferir que o tempo de bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$, internalização e reciclagem do receptor, a seletividade para outros alvos secundários em diferentes modelos celulares, monocamada e cultura 3D, podem estar envolvidos nas diferentes respostas biológicas (CASWELL, VADREU, NORMAN, 2009; MAS-MORUNO, RECHENMACHER, KESSLER,

2010).

O entendimento do comportamento da integrina $\alpha_v\beta_3$ que pode apresentar uma conformação fechada, fechada-extendida, extendida-aberta, após o bloqueio da DisBa-01, além da comparação com a via de sinalização em normóxia e hipóxia, também devem ser investigadas (TOLOMELLI et al., 2017).

Matrizes tridimensionais com diferentes proteínas, como o colágeno, vêm sendo construídas para entender o microambiente tumoral com mais profundidade mimetizando assim o ambiente *in-vivo* (LV et al. 2016) (HERROON, DIEDRICH, PODGORSKI, 2016). Algumas integrinas começaram a ser estudadas em diferentes matrizes e células tridimensionais, como as integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_5\beta_1$ em célula ovariana de câncer humano (A2780), e as subunidades β_4 e β_1 em linhagem celular de mama humano (HMT-3522 ou T4-2, célula de mama tumoral benigna, MECs célula epitelial de mama não tumoral) (CASWELL et al., 2008) (BISELL et al., 2002). Além disso, a matriz extracelular alterada pode desencadear um fenótipo invasivo de células epiteliais. De acordo com CAREY, MARTIN, REINHART-KING, 2017, a MCF10 embebida na matriz de colágeno levou ao aumento da expressão de gene mesenquimal, MT-MMP1 (metaloprotease tipo I de membrana).

Neste trabalho, analisamos colágeno em cultura 3D da célula MDA-MB-231 e HUVEC em normóxia e hipóxia por fluorescência. Embora o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ inibiram a migração direcional por quimiotaxia das células MDA-MB-231 em cultura 3D, não houve alteração do colágeno tipo I do compacto agregado na ausência ou presença da DisBa-01. Entretanto, já foi descrito a inibição de adesão da célula MDA-MB-231 no colágeno tipo I sob fluxo com o tratamento da DisBa-01, como uma simulação da corrente sanguínea (MONTENEGRO et al. 2012).

O colágeno tipo I é um ligante específico para as integrinas $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_1$ e capaz suportar a migração quimiotática na formação de tubo e brotamento da célula endotelial (DAVIS, SENGER, 2005). Embora a fluorescência do colágeno tipo I nos esferóides aumentaram na presença da DisBa-01 em normóxia, houve a inibição da migração quimiotática da cultura 3D de HUVEC em câmara de Boyden. Além disso as alterações do colágeno tipo I pode estar envolvido com a alternância dessas integrinas após o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ em normóxia e hipóxia (MAS-MORUNO, RECHENMACHER, KESSLER, 2010)

Dessa forma podemos reforçar que essa desintegrina RGD inibe a migração direcional das

diferentes células, como as células MDA-MB-231 e HUVECs em monocamada e 3D, além da inibição da formação de tubos de HUVEC em matrigel GFR que contém também o colágeno, principalmente em hipóxia (CASALI et al., 2022) (DANILUCCI et al., 2019)

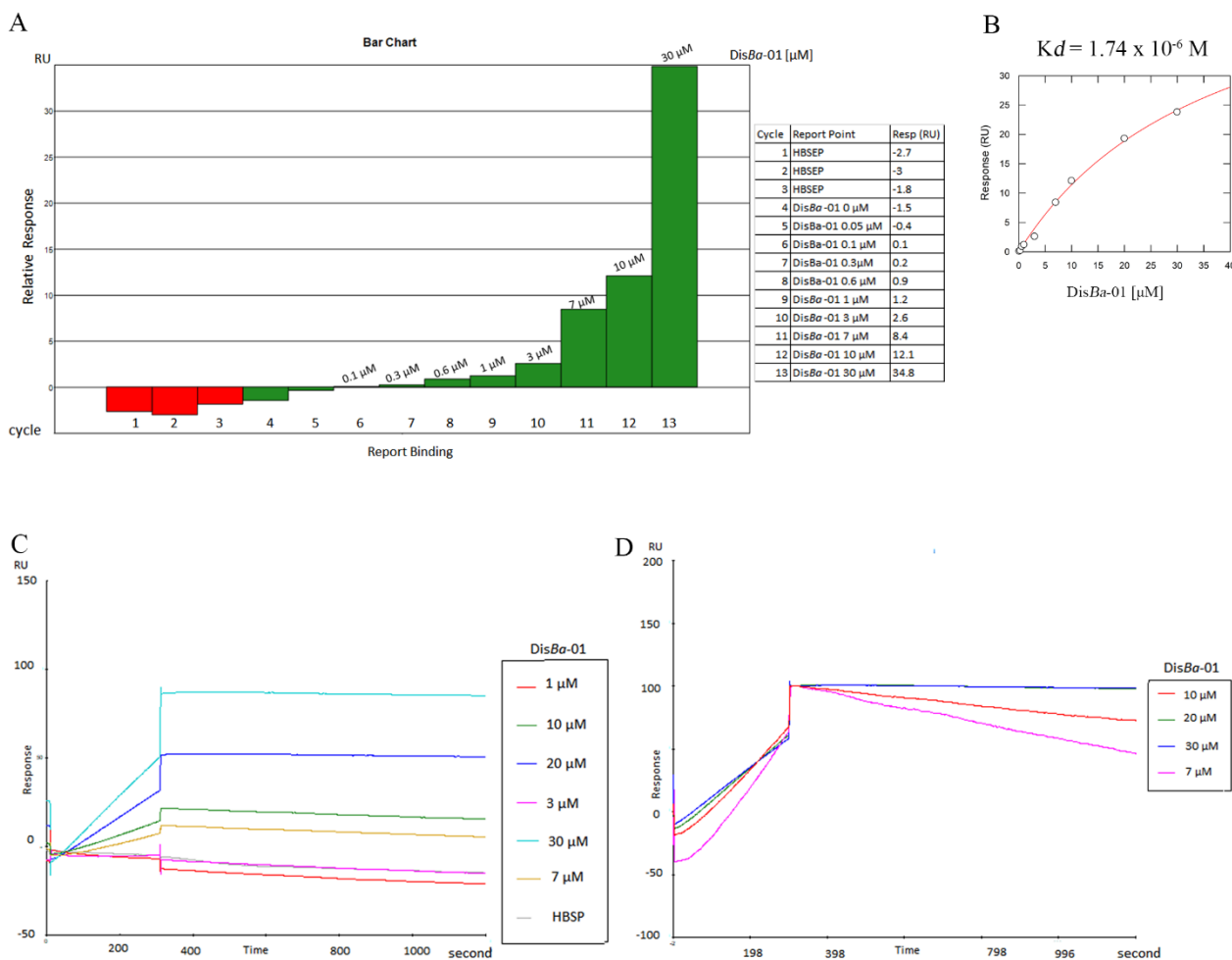
Concluimos que a integrina $\alpha_v\beta_3$ na cultura 3D da célula MDA-MB-231 e HUVEC é essencial para migração celular. Dessa forma, inferimos que a *DisBa-01* é um bom bloqueador para a integrina $\alpha_v\beta_3$ e um ótimo inibidor para migração direcional por quimiotaxia em cultura 3D em normóxia e hipóxia.

CAPÍTULO IV: A sutil interação entre a DisBa-01 com o VEGF-R2 e análise da EndoMT em HUVECs com o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$.

IV-A) RESULTADOS

O VEGF-R2 (pH 4,0) foi imobilizado atingindo 12916,0 RU numa concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ (Dados não mostrados). Após a aplicação da DisBa-01 no *chip* contendo o VEGF-R2, observou-se que para 7 μM da DisBa-01 ocorre interação com o VEGF-R2 em 8 RU (Fig. 18 A). A SPR mostrou a interação de $k_d = 1,74 \mu\text{M}$ ($1,74 \times 10^{-6} \text{ M}$) (Fig. 18 B). A figura 18 C mostra o sensograma RU x concentração da DisBa-01, e a figura D o sensograma após a retirada de algumas concentrações da DisBa-01 (*baseline* acima de 0).

Figura 18: A sutil interação entre DisBa-01 e o VEGF-R2. A) Gráfico da ligação da DisBa-01 com o VEGF-R2, Resposta Relativa (RU) x ciclo (concentração do analito), e tabela referente ao gráfico. B) Constante de dissociação (k_d) entre a DisBa-01 e o VEGF-R2. Cálculo analisado pelo GraphPad e feito no GraFit 7.0. C) Sensograma em RU (Unidade de Ressonância) x tempo (em segundos). D) Sensograma normalizado (baseline acima de 0), $n=3$.

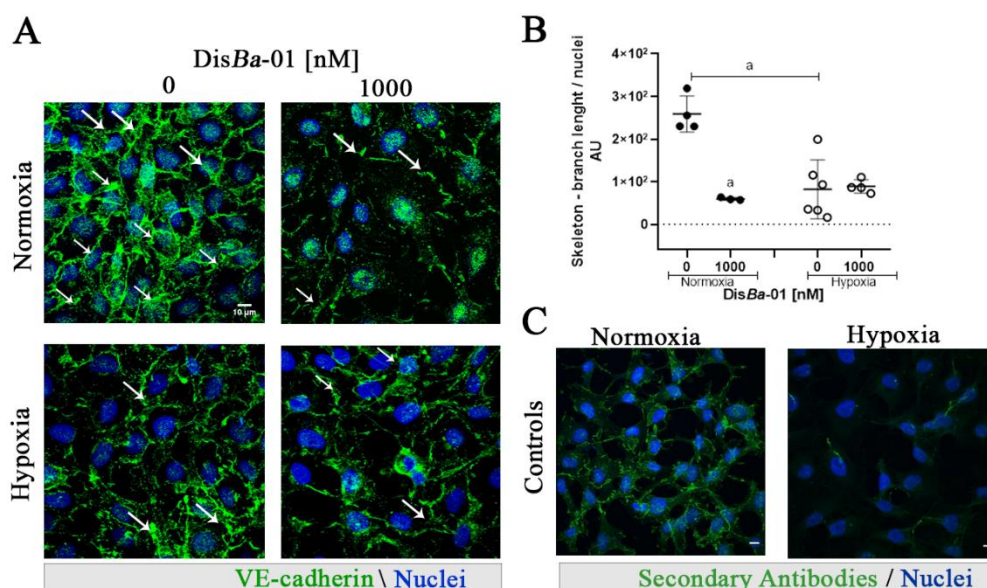


Embora a DisBa-01 apresente alta especificidade para a integrina $\alpha_v\beta_3$ e mostra ser seletivo para o VEGF-R2 e também para as proteínas de matriz (VN e FN), nos questionamos se essa desintegrina pode afetar o processo de EndoMT, já que existe um *cross-talking* entre a integrina $\alpha_v\beta_3$ e TGF- β , cujo é o principal marcador EMT (SCOTT, WEINBERG, LEMMON, 2019; MAMUYA, DUNCA, 2012). Assim analisamos a VE-caderina na HUVEC em normóxia e hipóxia após o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ em 1000 nM da DisBa-01.

Observamos um aumento da intensidade de fluorescência da VE-caderina em HUVECs em normóxia comparado a hipóxia. Além disso, houve uma diminuição da intensidade da fluorescência da VE-caderina na HUVEC com o tratamento da DisBa-01 e normóxia. Porém, não observamos

alterações entre as fluorescências das células sem e com o tratamento da DisBa-01 em hipóxia. Podemos observar as imagens da VE-caderina da figura 19-A, o resultado em B e o controle negativo em C.

Figura 19: Análise do marcador EndoMT com o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ através do tratamento da DisBa-01 na HUVEC em normóxia e hipóxia. A) Imagens da VE-caderina (em verde) em torno dos núcleos da HUVEC (em azul) em normóxia e hipóxia, com e sem o tratamento da DisBa-01. B) Quantificação da VE-caderina na HUVEC. C) Controle negativo. As imagens foram subtraídas pelo controle negativo, dividido pelos núcleos. A intensidade da VE-Caderina foi comparada usando ANOVA two-way com pós teste de Tukey ($p < 0,05$). A letra “a” dos gráficos representam as comparações das células não tratadas com as células tratadas com a DisBa-01 e também as células não tratadas em normóxia e hipóxia.



IV-B) DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O VEGF-R2 é o principal receptor para o VEGF que desempenha um dos papéis essenciais na angiogênese, como a proliferação, migração e sobrevivência da célula endotelial para a formação de vasos sanguíneos, contribuindo para a metástase tumoral (WANG et al. 2020). Curiosamente, o VEGF-R2 também com co-expressa em diferentes células tumorais, como a célula tumoral de mama tripla negativa (ZHU, ZHOE, 2015). Não se sabe exatamente função do VEGF-R2 nas células tumorais, mas já foi observado que a interação da proteína supressora de tumor, p53, com o complexo SWI/SNIF impacta a transcrição do VEGF-R2 na célula MDA-435, mostrando assim que SWI-SNIF pode ser mais um alvo terapêutico, mesmo para tumores que

apresentam mutação na p53 (PFISTER, et al. 2015).

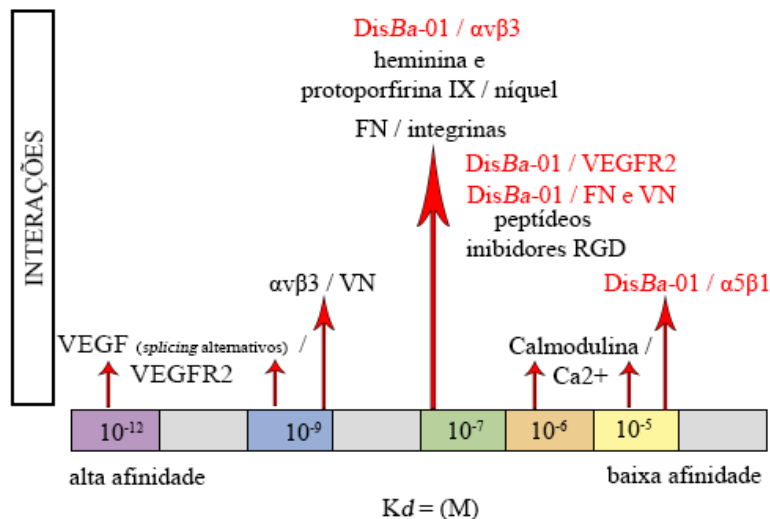
Uma possível ligação entre a DisBa-01 com o VEGF-R2 foi analisada por SPR. A DisBa-01 se ligou com uma $k_d = 1,74 \mu\text{M}$, observando uma afinidade 10 vezes menor comparada entre a interação da DisBa-01 com a integrina $\alpha_v\beta_3$, a qual mostrou afinidade ou $k_d = 4,63 \times 10^{-7} \text{ M}$, e equilíbrio de dissociação ou cinética $k_D = 1,6 \times 10^{-7} \text{ M}$, sendo que a k_d mostra o quão forte é a interação e o K_D é a razão entre k_d/k_a (CASALI, et al. 2022) (MONTENEGRO, et al. 2017) (RAMOS, et al. 2008).

A variação da ligações dos *splicings* alternativos do VEGF com o VEGFR2 estão entre $K_D = 0,67 \text{ pM}$ ($0,67 \times 10^{-12} \text{ M}$) e $1,4 \text{ nM}$ ($1,4 \times 10^{-9} \text{ M}$), ou seja, o VEGF é 1000 vezes ou 1.000.000 vezes mais específico do que a DisBa-01 (MAMER, WITTENKELLER, IMOUKHUED, 2020).

Ao fazer uma relação da concentração da DisBa-01 x 8 RU do ligante, a interação com a integrina $\alpha_v\beta_3$ foi a partir de $0,3 \mu\text{M}$ da DisBa-01 e para o VEGFR2 foi partir de $7 \mu\text{M}$ (MONTENEGRO, et al. 2017). CASALI et al., (manuscrito em redação) também mostrou a ligação entre a DisBa-01 com a FN e VN com uma $k_d \cong 4 \mu\text{M}$ formando uma âncora entre as proteínas de matriz com a célula. Mesmo assim observamos o bloqueio da DisBa-01 com a integrina $\alpha_v\beta_3$ pela alta afinidade dessa interação e diferentes respostas celulares como a inibição da migração da célula tumoral de mama e endotelial em normóxia e hipóxia (CASALI, et al., 2022) (LINO, et al., 2019) (DANILUCCI, et al., 2019).

A interação entre $\alpha_v\beta_3$ e VN foi demonstrada por BACHMANN, et al. 2017 com $k_d < 1\text{pM}$ (10^{-9} M) determinado por *biolayer interferometry*. Além disso, a FN interage com as diferentes células apresentando um $k_d = 8 \times 10^{-7} \text{ M}$ para alguns receptores, uma vez que a FN também se liga à integrina $\alpha_v\beta_3$ (BACHMAN, et al. 2015). A maioria dos peptídeos inibidores RGD apresentam $k_d = 10^{-6} \text{ M}$, mostrando assim a alta especificidade da ligação entre a DisBa-01 com a integrina $\alpha_v\beta_3$, o qual equivale uma interação entre as proteínas heminina e protoporfirina IX com o níquel $k_d = 0,5 \mu\text{M}$ ou $5 \times 10^{-7} \text{ M}$) e maior do que a interação entre a calmodulina com o Ca^{2+} ($k_d = 3 \times 10^{-6} \text{ M}$ à $2 \times 10^{-5} \text{ M}$) (Fig.20) (LIU, PAN, XU, 2010) (SHEPHERD, et al. 2007) (CROUCHX, KLEE, 1980).

Figura 20: Diferentes interações em $k_d=[M]$ entre analito x ligante.



A interação entre a DisBa-01 com o VEGF-R2, mesmo mostrando uma menor afinidade, corrobora a colocalização de ambas proteínas na HUVEC analisada por DANILUCCI et al., 2019.

Observamos que o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ inibe a migração da célula MDA-MB-231 e HUVEC com o tratamento da DisBa-01 em normóxia e hipóxia (CASALI et al., 2022). Dessa forma inferimos que o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ e a seletividade para outras proteínas de matriz (VN e FN) e o VEGF-R2 na HUVEC com a presença da DisBa-01, principalmente em 1000 nM, pode atrapalhar o processo de endoMT na célula endotelial, além da célula MDA-MB-231. Para confirmar esse evento analisamos o marcador endotelial VE-caderina em HUVECs no bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ com o tratamento da DisBa-01 em 1000 nM.

Demonstramos um aumento da intensidade de fluorescência da VE-caderina na HUVEC em normóxia, podendo identificar que o fenótipo tipo epitelial e as junções das células endoteliais estão mais evidentes em normóxia do que em hipóxia (Fig.15-B). Resultado que corrobora ao LIU et al., (2019) que observaram a diminuição da VE-caderina na HUVEC em baixa oxigenação em 24, 48 e 72h por *western blotting*.

Além disso CASALI et al., (2022) observaram uma morfologia circular para célula MDA-MB-231 e aumento da pro-MMP9 com o bloqueio $\alpha_v\beta_3$ da integrina através do tratamento da DisBa-01 em normóxia e hipóxia, tendo evidências que as células estão em transição da EMT e MET de acordo com BATHIA et al., 2020. O mesmo observamos para HUVEC, podendo inferir o a transição EndoMT (CASALI et al., 2022; DANILUCCI et al., 2017; BATHIA et al., 2020).

A interação entre a osteopontina (OPN) com a integrina $\alpha_v\beta_3$ induz o HIF1- α aumentar a

expressão da mTOR ativando TCF12, cujo repressor da VE-caderina. Foi identificado que a célula endotelial tratada com OPN reduz a VE-caderina e aumenta a invasão e a migração celular (FAN, et al., 2018). Embora o bloqueio da $\alpha_v\beta_3$ com o tratamento da *DisBa-01* diminui a fluorescência da VE-caderina na célula endotelial em normóxia, assim como ocorre com o tratamento da OPN, houve a inibição da migração da HUVEC por 6h de acordo com DANILUCCI et al., 2019, porém por 24h não apresentou diferença entre as células tratadas ou não com a *DisBa-01* na célula endotelial em normóxia (CASALI et al. 2022). Além disso o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ e a seletividade para as outras proteínas na HUVEC em normóxia com o tratamento da *DisBa-01* pode estar relacionado com a diminuição do fenótipo endotelial e perdas sutis das junções endoteliais analisado pela VE-caderina e morfologia celular (MAS-MORUNO, RECHENMACHER, KESSLER, 2010; CASALI et al. 2022).

Não observamos alterações entre as fluorescências das células sem tratamento e com o tratamento da *DisBa-01* em hipóxia, reforçando que as células estão em processo entre EndoMT e MET, com a diminuição das junções endoteliais, porém ocorrendo a inibição da migração no bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ na HUVEC e alteração da morfologia em hipóxia (CASALI et al., 2022).

A VE-caderina está presente no brotamento das células endoteliais, aumentando assim a angiogênese (CLERE, RENAULT, CORRE, 2020). Porém mostramos a diminuição da formação do tubo nas HUVEC com o tratamento da *DisBa-01* em normóxia e hipóxia (DANILUCCI et al., 2019; CASALI et al., 2022).

Dessa forma concluímos que a *DisBa-01* pode afetar rapidamente a ativação do eixo VEGF/VEGFR2, tendo alta especificidade para a integrina $\alpha_v\beta_3$, podendo ser seletivo para VEGFR2 e também as proteínas de matriz, VN e FN, inferindo o processo entre EndoEMT e MET para células endoteliais, incluindo mais um modelo anti-angiogênico e corroborando aos resultados de CASSINI-VIEIRA, et al., 2014, DANILUCCI et al., 2019 e CASALI et al., 2022.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

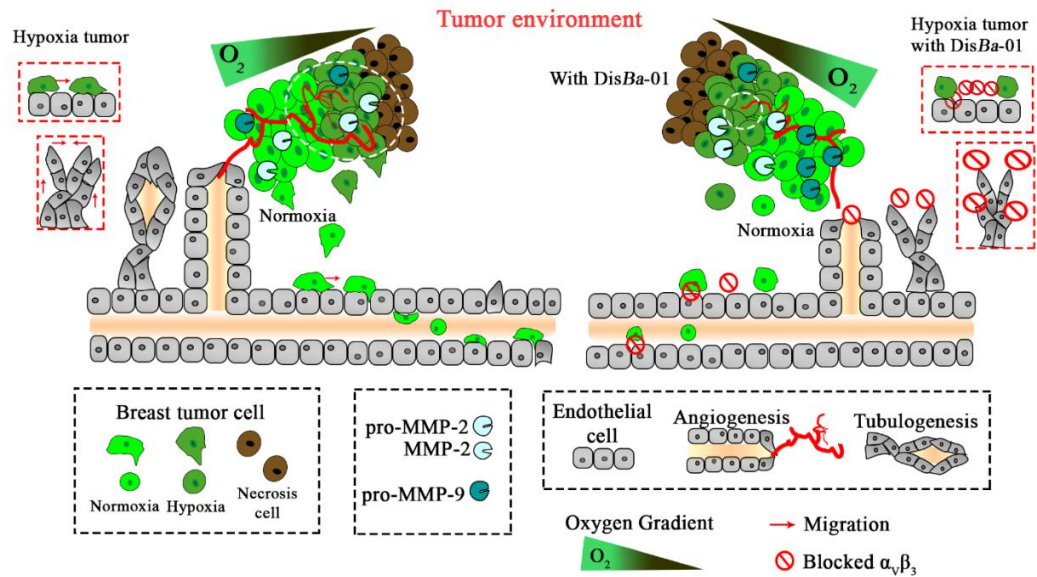
Nossos resultados indicam que o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ em condições de hipóxia pode demandar uma maior concentração de inibidores. A *DisBa-01* se liga na integrina $\alpha_v\beta_3$ em alta afinidade, requer no máximo 1000 nM para inibir a migração em monocamada para célula tumoral MDA-MB-231 e HUVEC, porém se torna mais efetivo para migração quimiotóxica em cultura 2D em normóxia e em hipóxia a partir 10 nM dessa desintegrina RGD.

A célula MDA-MB-231 provenientes dos compactos agregados forma uma curva em sino na faixa de concentração da *DisBa-01* entre 10 e 1000 nM apresentando a inibição em curva em U, diferentemente dos esferoides que apresentam uma inibição em curva sigmoideal na mesma faixa de concentração da *DisBa-01*.

Neste trabalho também foi possível confirmar que a *DisBa-01* ancora na HUVEC através da ligação entre os componentes da matriz, VN e FN, apresentado um efeito de *SCANVAGER* dessas proteínas de matriz impedindo a interação com os seus receptores. Outro efeito dessa desintegrina é a interação integrina $\alpha_v\beta_3$ em alta afinidade competindo com o agonista endógeno FN e VN, se comportando com o efeito de agonista pleno, além de afetar brevemente a ativação do eixo VEGF/VEGFR2. Devemos considerar que cada tipo celular corresponde o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ em diferentes tempos e afetando o desenvolvimento do microambiente tumoral (Fig. 21).

Este trabalho pôde contribuir para o entendimento da complexidade do bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ em hipóxia e os mecanismos de ação da *DisBa-01* com as sítis interações em seus alvos secundários. Além disso, questionamentos podem ser provocados para desenvolvimentos de novos projetos.

Figura 21: Esquema da análise das considerações finais. Inferimos que o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ pode dificultar o desenvolvimento e migração no microambiente tumoral em normóxia e em hipóxia.



6. REFERÊNCIAS

- ATA, R. ANTONESCU. C.N, Integrins and Cell Metabolism: An Intimate Relationship Impacting Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, n1, 2017.
- BACHMANN, M., et al., Force-Dependent Ligand Sensing Enables $\alpha V\beta 3$ Integrin to Differentiate between Fibronectin and High-Affinity Ligands Introduction, *bioRxiv*, v10, 2017.
- BADEA, M. A., et al., Influence of Matrigel on Single- and Multiple-Spheroid Cultures in Breast Cancer Research. **SLAS Discovery**, v.24, n.5, p.563–78, 2019.
- BARCZYK, M., CARRACEDO, S., GULLBERG, D., Integrins. **Cell and Tissue Research**, v.339, n.1, p.269–80, 2010.
- BATHIA et al., New Insights Into the Role of Phenotypic Plasticity and EMT in Driving Cancer Progression. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v.7, n.71, 2020.
- BAUVOIS, B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1825, n. 1, p. 29-36, 2012.
- BERTOOUT, J. A., PATEL, S. A., SIMON, M. C. The Impact of O₂ Availability on Human Cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v.8, n.12, p.967–75, 2008.
- BISSELL, M J; et al., Beta 4 Integrin-Dependent Formation of Polarized Three- Dimensional Architecture Confers Resistance to Apoptosis in Normal and Malignant Mammary Epithelium. **Cancer Cell**, v.2, p.205–16, 2002.
- BRESLIN, S. L., DRISCOLL, O. Three-Dimensional Cell Culture: The Missing Link in Drug Discovery. **Drug Discovery Today**, v.18, n.5, p.240–49, 2013.
- BROOKS, D, L. et al., ITGA6 Is Directly Regulated by Hypoxia-Inducible Factors and Enriches for Cancer Stem Cell Activity and Invasion in Metastatic Breast Cancer Models. **Molecular Cancer**, v.15, n.1, 2016.
- BURROUGHS, S. K., et al., Hypoxia inducible factor pathway inhibitors as anticancer therapeutics. **Future Med Chem.**, v.5, n.5, p.1–31, 2014.
- CALVETE, J. J. Toxicon The Continuing Saga of Snake Venom Disintegrins. **Toxicon**, v.62, p.40–49, 2013.
- CAREY, S.P., MARTIN, K.E, REINHART-KING, C.A., Three-Dimensional Collagen Matrix Induces a Mechanosensitive Invasive Epithelial Phenotype. **Scientif Report**, v.7, p.1–14, 2017.
- CASALI, B. C., et al, The Effects of $\alpha v\beta 3$ Integrin Blockage in Breast Tumor and Endothelial Cells under Hypoxia in Vitro. **International Journal of Molecular Science**, v.23, n.3, p.1–17,

2022.

CASSINI-VIEIRA, et al., “DisBa-01 Inhibits Angiogenesis, Inflammation and Fibrogenesis of Sponge-Induced-Fibrovascular Tissue in Mice. **Toxicon**, v.92, p.81–89, 2014.

CASWELL, P. T., et al., Rab-Coupling Protein Coordinates Recycling of A5 β 1 Integrin and EGFR1 to Promote Cell Migration in 3D Microenvironments. **Journal of Cell Biology**, v.183, n.1, p.143–55, 2008.

CASWELL, P. T., VADREVU, S, NORMAN, J. C. Integrins: Masters and Slaves of Endocytic Transport, **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.10, n.12, p.843–53, 2009.

CELIK, I. Therapeutic Efficacy of Endostatin Exhibits a Biphasic Dose-Response Curve, **Cancer Research**, v.65, n.23, 2005.

CLERE, N. RENAULT, S. CORRE, I, Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. **Frontiers in Cell and Developmental**, v.8, n.747, 2020

CHANG, H. Y. et al., Gene Expression Signature of Fibroblast Serum Response Predicts Human Cancer Progression: Similarities between Tumors and Wounds. **PLoS BIOLOGY** v.2, n.2, p.206–14, 2004.

CHATURVEDI, P. et al., Hypoxia-Inducible Factor – Dependent Breast Cancer – Mesenchymal stem Cell Bidirectional Signaling Promotes Metastasis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.123, n.1, p.189-205, 2013.

CHOI, J. Y., et al., Overexpression of MMP-9 and Hif-1 α in Breast Cancer Cells under Hypoxic Conditions, **Journal of Breast Cancer**, v.14, n.2, p.88–95, 2011.

CHUNG, J., et al., Hypoxia-Induced Vascular Endothelial Growth Factor Transcription and Protection from Apoptosis Are Dependent on α 6 β 1 Integrin in Breast Carcinoma Cells. **Cancer Research**, v.64, n.617, p.4711–16, 2004.

CLAPP, C. et al., Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis. **Physiological Reviews**, v.89, n.4, p.1177–1215, 2009.

CROUCHX, T, H., B. KLEE, C. Positive Cooperative Binding of Calcium to Bovine Brain Calmodulin. **Biochemistry**, v.19, p.3692–98, 1980.

DAHL, K, D. et al., Hypoxia-Inducible Factor Regulates α v β 3 Integrin Cell Surface Expression. **Mol Bio Cell**, v.16, n.4, p.1901–12, 2005.

DAI, X., et al., Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. **Journal of Cancer**, v.8, p.3131–41, 2017.

DANILUCCI, T. M., et al., Recombinant RGD-Disintegrin DisBa-01 Blocks Integrin α v β 3 and Impairs VEGF Signaling in Endothelial Cells. **Cell Communication and Signaling**, v.17, n.1,

p.1–15, 2019.

DAVIS, G., SENGER, D., Endothelial Extracellular Matrix. **Circulation Research**, v.97, n.11, p.1–15. 2005.

DOÑATE, F. et al., Pharmacology of the Novel Antiangiogenic Peptide ATN-161 (Ac-PHSCN-NH₂): Observation of a U-Shaped Dose-Response Curve in Several Preclinical Models of Angiogenesis and Tumor Growth. *Clin Cancer Res*, v.14, n.7, 2137-2144, 2008.

DUNN, L. K. Hypoxia and TGF-beta Drive Breast Cancer Bone Metastases through Parallel Signaling Pathways in Tumor Cells and the Bone Microenvironment. **PLoS ONE**, v.4, n.9, 2009.

FAN, C. et al., Osteopontin–integrin engagement induces HIF-1 α –TCF12-mediated endothelial-mesenchymal transition to exacerbate colorectal cancer. **Oncotarget**, v.9, n.4, 2018.

FISCHBACH et al., Cancer cell angiogenic capability is regulated by 3D culture and integrin engagement. *Proceedings of the National Academy of Sciences, PNAS*, v.106, n.2, p.399–404, 2009.

FOX, J. W., SERRANO, S M. T. Insights into and Speculations about Snake Venom Metalloproteinase (SVMP) Synthesis, Folding and Disulfide Bond Formation and Their Contribution to Venom Complexity. **FEBS Journal**, v.275, n.12, p.3016–30, 2008.

FROEHLICH, K., et al., Generation of Multicellular Breast Cancer Tumor Spheroids: Comparison of Different Protocols. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.21, p.89-98, 2016

GARCIA, E., et al., Inhibition of Triple Negative Breast Cancer Metastasis and Invasiveness by Novel Drugs That Target Epithelial to Mesenchymal Transition. **Scientific Reports**, v.11, n.1, p.1-15, 2021.

GERHARDT, H., SEMB, H. Pericytes: gatekeepers in tumour cell metastasis. **J. Mol. Med.**, v.86, p.135–144, 2008

GERSTNER et al., A phase I study of cediranib in combination with cilengitide in patients with recurrent glioblastoma, **Neuro Oncol.**, v.17, n.10, p.1386-92, 2015.

GILKES, D. M., SEMENZA, G. L., WIRTZ, D. Hypoxia and the Extracellular Matrix: Drivers of Tumour Metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v.14, n.6, p.430–39, 2014.

HADDAD, T. et al. A phase I study of cilengitide and paclitaxel in patients with advanced solid tumors. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v.79, n.6, p.1221-1227, 2017.

HAMIDI, H. IVASKA, J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. **Nature Review/Cancer**, v.18, p.533-548, 2018

HE, L, et al., The Prognosis Comparison of Different Molecular Subtypes of Breast Tumors after Radiotherapy and the Intrinsic Reasons for Their Distinct Radiosensitivity. **Cancer Management**

and Research, v.11, p.5765–75, 2019.

HERROON, K.M.; DIEDRICH, J.D., PODGORSKI, I. New 3d-Culture Approaches to Study Interactions of Bone Marrow Adipocytes with Metastatic Prostate Cancer Cells. **Frontiers in Endocrinology**, v.7, 2016.

HICKMAN, J.A, et al., Three-Dimensional Models of Cancer for Pharmacology and Cancer Cell Biology: Capturing Tumor Complexity in Vitro / Ex Vivo. **Biotechnol J**, v.9, n.9, p.1115-25, 2014.

HOWE, G. A., ADDISON, C. L., $\beta 1$ integrin, An emerging player in the modulation of tumorigenesis and response to therapy. **Cell Adhesion & Migration**, v.6, n.2, p.71–77, 2012.

HSIO et al., Pathological and therapeutic aspects of matrix metalloproteinases: implications in childhood leukemia. **Cancer and Metastasis Reviews**, v.38, n.4, p.829-837, 2019.

JOYCE, J., A.; POLLARD, J., W. Microenviromental regulation of metastasis, **Nat Rev Cancer**, v.9, n.4, p.239-252, 2009.

JU et al., Hypoxia Selectively Enhances Integrin $\alpha 5\beta 1$ Receptor Expression in Breast Cancer to Promote Metastasis, **Mol Cancer Res.**, v.15, n.6, p.723-734, 2017.

KATT, et al., *In Vitro* Tumor Models: Advantages, Disadvantages, variables, and Selecting the Right Platform. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.4, n.12, 2016.

KAUSKOT, A. *et al.* Hemostatic effects of recombinant DisBa-01, a disintegrin from *Bothrops alternatus*. **Biochem Biophys Res Commum**, v.13, p.169-173, 2008.

KHAN, M. I, et al., Hypoxia Driven Glycation: Mechanisms and Therapeutic Opportunities, **Seminars in Cancer Biology**, v.49, p.75-82, 2017.

LI et al., Novel Pure $\alpha V\beta 3$ Integrin Antagonists That Do Not Induce Receptor Extension, Prime the Receptor, or Enhance Angiogenesis at Low Concentrations. **ACS Pharmacology & Translation Science**, v. 2, p. 387–401, 2019.

LIMA et al., EMT in Breast Carcinoma - A Review, **Journal of Clinical Medicine**, v.5, n.7, 2016.

LINO, R. Alphavbeta3 Integrin Blocking Inhibits Apoptosis and Induces Autophagy in Murine Breast Tumor Cells. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Res**, v.1886, n.12. 2019.

LIU, Y., PAN Y., XU Y. Binding Investigation of Integrin $A\alpha\beta 3$ With Its Inhibitors by SPR Technology and Molecular Docking Simulation. **Journal of Biomolecular Screening**, v.15, n.2, p.131–37, 2010.

LIU, C. et al., Autophagy mediates 2-methoxyestradiol-inhibited scleroderma collagen synthesis andendothelial-to-mesenchymal transition induced by hypoxia. **Rheumatology**, n.58, p.1966-1975 2019.

- LV, D., et al, A Three-Dimensional Collagen Scaffold Cell Culture System for Screening Anti-Glioma Therapeutics. **Oncotarget**, v.7, n.35, p.5694-56914, 2016.
- MACÊDO, J.K.A. et al., Disintegrins from Snake Venoms and their Applications in Cancer Research and **Therapy**. **Curr. Prot. Pep. Sci.**, v.16, p.532-548, 2015.
- MAMER, S. B., WITTENKELLER, A., IMOUKHUED, P. I. OPEN VEGF - A Splice Variants Bind VEGFRs with Differential Affinities. **Scientific Reports**, v.10, p.1–8, 2020.
- MAMUYA, F. A., DUNCAN M. K, α V integrins and TGF- β -induced EMT: a circle of regulation. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.16, n.3, p. 445-455, 2012.
- MAS-MORUNO, C. RECHENMACHER, F. KESSLER, H. Cilengitide: The First Anti-Angiogenic Small Molecule Drug Candidate. Design, Synthesis and Clinical Evaluation. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.10, p.753-768, 2010.
- MEDICI, D., KALLURI, R. Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype, **Semin Cancer Biol.**, v.22, n.5-6, p.379–384, 2012.
- MOMIC, T., KATZEHENDLER, J., BENNY, F., Vimocin and Vidapin, Cyclic KTS Peptides, Are Dual Antagonists of A1b1/A2b1 Integrins with Antiangiogenic Activity. **J Pharmacol Exp Ther.**, v.350, n.3, p.506-519, 2014
- MONTENEGRO, C. F., *et al.* A recombinant RGD disintegrin inhibits the migration of Oral Squamous Cell Carcinoma due to modulation on cell adhesion. **PLoS One**, v.12, n.4, p.1-14, 2017.
- MORITZ, O. M, et al., Alternagin-C, an Alpha2beta1 Integrin Ligand, Attenuates Collagen-Based Adhesion, Stimulating the Metastasis Suppressor 1 Expression in Triple-Negative Breast Tumor Cells. **Toxicon**, v.210, p.1–10, 2022.
- MORITZ, O. M, et al., Alternagin-C binding to α 2 β 1 integrin controls matrix metalloprotease-9 and matrix metalloprotease-2 in breast tumor cells and endothelial cells, **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, n.13, 2018.
- MUÑOZ-NÁJAR, U. M., Hypoxia Stimulates Breast Carcinoma Cell Invasion through MT1-MMP and MMP-2 Activation. **Oncogene**, v.25, n.16, p.2379–92, 2006.
- NAPOLITANO, A. P., et al., Short Technical Reports Scaffold-Free Three-Dimensional Cell Culture Utilizing Micromolded Nonadhesive Hydrogels. **Biotechniques**, v.43, n.4, p.496-500, 2007.
- NATH, S.; DEVI, G., Three-Dimensional Culture Systems in Cancer Research: Focus on Tumor Spheroid Model. **Pharmacol Ther**, v.163, p.94–108, 2017
- NYBERG, P., SALO, T., KALLURI, R. “Tumor Microenvironment and Angiogenesis. **Frontiers**

in **Bioscience**, v.13, n.1, p.6537–53, 2008.

OSINSKY, S., ZAVELEVICH, M., VAUPEL, P. Tumor Hypoxia and Malignant Progression. **Experimental Oncology**, v.31, n.2, p.80–86, 2009.

OWEN, S.C. Colloidal Drug Formulations Can Explain “Bell-Shaped” Concentration–Response Curves. **Acs Chemical Biology**, v.9, p.777-784, 2014.

PARK, H.J, HELFMAN, D. M. Up-regulated fibronectin in 3D culture facilitates spreading of triple negative breast cancer cells on 2D through integrin β -5 and Src. **Scientif Report**, v.9, n.1, 2019.

PASZEK, M., et al., Tensional Homeostasis and the Malignant Phenotype. **Cancer Cell**, v.8, n.3, p.241–54, 2005.

PETROVA, V. et al., The Hypoxic Tumour Microenvironment. **Oncogenesis**, v.7, n.1, 2018.

PFISTER, N. T., et al., Mutant P53 Cooperates with the SWI / SNF Chromatin Remodeling Complex to Regulate VEGFR2 in Breast Cancer Cells. **Genes & Development**, v.29, p.1298–1315, 2015.

PLATEL, V. et al., Endothelial-to-Mesenchymal Transition (EndoMT): Roles in Tumorigenesis, Metastatic Extravasation and Therapy Resistance. **Journal of Oncology**, 2019.

PROVENZANO, P. P., KEELY, P. J. The Role of Focal Adhesion Kinase in Tumor Initiation and Progression, **Cell Adhesion Migration**, v.3, n.1, p.347–50, 2009.

QUINTERO-FABIÁN, S. et al., Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. **Frontiers in Oncology**, v.9, 2019,

RADISKY, E.S, RAEESZADEH-SARMAZDEH, M., RADISKY, D.C. Therapeutic Potential of Matrix Metalloproteinase Inhibition in Breast Cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.118, p.3531–3548, 2017.

RAHIMI, N. The Ubiquitin-Proteasome System Meets Angiogenesis. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.11, n.3, p.538–48, 2012.

RAMACHANDRAN, S., et al., Epigenetic Therapy for Solid Tumors: Highlighting the Impact of Tumor Hypoxia. **Genes**, v.6, n.4, p.935–56, 2015.

RAMOS, O.H.P. *et al.* A novel avb3-blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. **Clinical & Experimental Metastasis**, v.25, n.1, p.53-64, 2007.

REYMOND, N., BORDA D’ÁGUA, B. RIDLEY, A. J., Crossing the Endothelial Barrier during Metastasis. **Nature Reviews, Cancer**, v.13, n.12, p.858–70. 2013.

SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; PONTES, C. L.; MONTENEGRO, C. F.; MARTIN, A. C. Snake venom disintegrins and cell migration. **Toxins (Basel)**, v.2, n.11, p. 2606-21, 2010.

SCOTT, WEINBERG, LEMMON, Mechanochemical Signaling of the Extracellular Matrix in Epithelial-Mesenchymal Transition, **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v.7, n.135, 2019.

SHEPHERD, M. et al., NikA Binds Heme : A New Role for an Escherichia Coli Periplasmic. **Biochemistry**, v.46, p.5030–37, 2007.

SHOVAL, H, et al., Tumor Cells and Their Crosstalk with Endothelial Cells in 3D Spheroids. **Scientific Reports**, v.7, n.1, p.1–11. 2017.

SORG, B. S., Spectral Imaging Facilitates Visualization and Measurements of Unstable and Abnormal Microvascular Oxygen Transport in Tumors, **J Biomed Opt**, v.13, n.1, p.1–11, 2008

STADLER et al., Increased complexity in carcinomas: analyzing and modeling the interaction of human cancer cells with their microenvironment, **Seminars in Cancer Biology**. v.35, p.107-124, 2015.

STATON et al., A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. **International Journal Experimental Pathology**, v.90, p.195–221, 2009.

STUART, M. P., et al., Successful Low-Cost Scaffold-Free Cartilage Tissue Engineering Using Human Cartilage. **Stem Cells Int**, p.1-11, 2017

SUNG, H., et al., Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer Journal for Clinicians**, v.71, n.3 p.209–249, 2021

Survey of Small Molecules Integrin Activators, **Cancers**, v.9, n.78; 2017.

TAM, S. Y., WU, V. W. C, LAW, H. K. W. Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancers: HIF-1a and Beyond. **Frontiers in Oncology**, v.10, 2020.

TOLOMELLI, A. et al., Can Integrin Agonists Have Cards to Play against Cancer? A Literature

VAKHRUSHEV, I. V. et al., Heterotypic Multicellular Spheroids as Experimental and Preclinical Models of Sprouting Angiogenesis. **Biology**, v.11, n.18, 2022.

WALIA, A. Endostatin's Emerging Roles in Angiogenesis, Lymphangiogenesis, Disease, and Clinical Applications. **Biochim Biophys Acta**, v.1850, n.12, p.2422-2438, 2015.

WANG, X., et al., Molecular Bases of VEGFR-2-Mediated Physiological Function and Pathological Role. **Front Cell Dev Biol**, v.8, p.1–12, 2020.

ZELTZ, C., ORGEL, J., GULLBERG, D., Molecular Composition and Function of Integrin-Based Collagen Glues - Introducing COLINBRIs. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1840, n.8, p.2533–

48, 2014.

ZHAO, Y., ADJEI. A. A., Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor. **The Oncologist**, v.20, n.6, p.660–73, 2015.

ZHU, X., ZHOE, W., The Emerging Regulation of VeGFR-2 in Triple-Negative Breast Cancer. **Front Endocrinol**, v.6, p.1–7, 2015.

7. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigo publicado

BRUNA C. CASALI, LARISSA T. GOZZER, MATHEUS P. BAPTISTA, WANESSA F. ALTEI, HELOISA S. SELISTRE-DE-ARAÚJO. The Effects of $\alpha v \beta 3$ Integrin Blockage in Breast Tumor and Endothelial Cells under Hypoxia In Vitro. **Int. J. Mol. Sci.** 2022, 23, 1745.

Artigos em colaboração

MILENE NÓBREGA DE OLIVEIRA MORITZ, **BRUNA CARLA CASALI**, ULIANA SBEGUEN STOTZER, PATTY KARINA DOS SANTOS, HELOISA SOBREIRO SELISTRE-DE-ARAÚJO Alternagin-C, a $\alpha_2 \beta_1$ integrin ligand, stimulated the metastasis suppressor 1 (*MTSS1*) expression and attenuated collagen-based adhesion in triple-negative breast tumor cells. **Toxicon.** S0041-0101 (22).2022. doi: 10.1016/j.toxicon.2022.02.001

DANILUCCI, T. M., SANTOS, P. K., PACHANE, B. C., PISANI, G. F. D., LINO, R. L. B., **CASALI, B. C.**, SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Recombinant RGD-disintegrin DisBa-01 blocks integrin $\alpha v \beta 3$ and impairs VEGF signaling in endothelial cells. **Cell Communication and Signaling**, 17(1), 1–15, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0339-1>

MONTENEGRO, CYNTIA F.; **CASALI, BRUNA C.**; LINO, L. B.; PACHANE, BIANCA C.; SANTOS, P. K.; HORWITZ, ALAN R.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; LAMERS, M. L. Inhibition of $\alpha v \beta 3$ integrin induces loss of cell directionality of oral squamous carcinoma cells (OSCC). **PLoS One**, 2017, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176226>

Artigo submetido

TALITA V BARBOSA, **BRUNA C CASALI**, JANAINA A DERNOWSEK, RAUL J R TOBAR, CARLOS A FORTULAN¹, EDUARDO B FERREIRA, HELOISA S SELISTRE-DE-ARAÚJO, MARCIA C BRANCIFORTI: Fabrication and morphological, mechanical and biological performance of 3D printed poly(ϵ -caprolactone)/bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering applications. **Biomedical Materials**

Manuscrito em redação

CASALI, B.C, Moritz, M.N.O.; ALTEI, W.F.; PACHANE, B.C.; STOTZER, U.S; DANILLUCI, T.M; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. DisBa-01 anchors endothelial cells to fibronectin and vitronectin through $\alpha_v\beta_3$ integrin