

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

EFEITOS DAS DESINTEGRINAS ALTERNAGINA-C E DisBa-01
DE *Bothrops alternatus* EM FIBROBLASTOS, CÉLULAS
ENDOTELIAIS E TUMORAIS

Juliana Uema Ribeiro

SÃO CARLOS – SP
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

EFEITOS DAS DESINTEGRINAS ALTERNAGINA-C E DisBa-01
DE *Bothrops alternatus* EM FIBROBLASTOS, CÉLULAS
ENDOTELIAIS E TUMORAIS

Juliana Uema Ribeiro

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução.

SÃO CARLOS – SP
2009

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

R484ed

Ribeiro, Juliana Uema.

Efeitos das desintegrinas Alternagina-C e DisBa-01 de *Bothrops alternatus* em fibroblastos, células endoteliais e tumorais / Juliana Uema Ribeiro. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

175 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Biologia celular. 2. Desintegrinas. 3. Células - adesão. 4. Neovascularização. 5. VEGF (Fator de Crescimento de Endotélio Vascular). 6. Expressão gênica. I. Título.

CDD: 574.87 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**EFEITOS DAS DESINTEGRINAS ALTERNAGINA-C E
DISBA-01 DE BOTHROPS ALTERNATUS EM
FIBROBLASTOS, CÉLULAS ENDOTELIAIS E
TUMORAIS**

Tese de Doutorado de Juliana Uema Ribeiro

Banca Examinadora

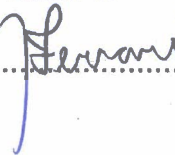
Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo

Profa. Dra. Veronica Morandi

Profa. Dra. Maria Luísa Vilela Oliva

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza

Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari



Orientadora
Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo

Dedico este trabalho aos meus pais,
José e Reiko, à minha irmã, Renata, e ao meu noivo, Thiago

AGRADECIMENTOS

Faço parte do grupo orientado pela Profa Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo há vários anos, desde a iniciação científica, hoje registro agradecimentos na minha tese de doutorado! Tenho bastante a agradecer a esta pessoa, por sua orientação, confiança e paciência! Muito obrigada!

Agradeço também aos meus atuais colegas de laboratório, Aninha, Araceli, Bete querida, Carmen, Carol, Cyntia, Daíse, Daniela, Elaine, Kelli, Lívia, Natália, Nathália, Patrícia, Patty, Rita, Sabrina, Sílvia, Uliana, Verônica e Zé Roberto, pelos momentos descontraídos e pelas contribuições ao trabalho.

Em tanto tempo no laboratório já conheci várias pessoas que não fazem mais parte do grupo, mas em alguns casos tive tanta sorte que hoje algumas ex-colegas são amigas muito queridas! Obrigada Sabrina, Mônica, Cristina, Raquel e Ana, por termos dividido tantos momentos divertidos e prazerosos (além dos científicos!) no laboratório e por continuarmos a fazê-lo fora dele, sou grata por ter amigas como vocês!

Entre as pessoas que saíram, tenho um agradecimento especial para duas delas, atualmente em outros laboratórios. Aline e Rafael, meus ex- “aluninhos-escravinhos” de IC, vocês me ajudaram muito, têm grande participação no trabalho que descrevi nesta tese, obrigada! Espero ter contribuído para formação de vocês como pesquisadores, vocês certamente contribuíram para a minha!

O trabalho descrito nesta tese foi desenvolvido em parceria com outros centros de ensino e pesquisa. Agradeço fortemente a Profa Verônica Morandi, da UERJ, pelas oportunidades de realizar experimentos em seu laboratório, aprendendo bastante com ela e com seu grupo sempre prestativo e simpático, obrigada!

Agradeço grandemente a oportunidade de ter sido orientada pelos Prof Dr. Michel Crépin e Dra. Françoise Fauvél-Lafève durante estágio na U553 do INSERM (França). Além de poder compartilhar de um pouco da grande competência destes profissionais, partilhei de momentos agradáveis na cidade-Luz!

Agradeço também aos colegas da U553 do INSERM (França) pela acolhida e pelo apoio, em especial a Ibtissem e a Irma, por terem me feito sentir em casa em um lugar tão diferente! *Merci à tous les membres de l'unité 553 pour leur accueil !!!*

Agradeço aos meus pais, José e Reiko, e à minha irmã, Renata, por TUDO, MUITO OBRIGADA! Pelo apoio desde o início, muito antes de vir para São Carlos, pelas palavras e gestos durante toda a graduação, mestrado, doutorado... Também agradeço minhas avós e meus avôs (*in memoriam*), tios e primos, pela confiança enorme e orgulho. Espero sempre poder corresponder à expectativa de todos!

Agradeço ao meu noivo, Thiago, por TUDO também! Todo o AMOR que temos, nossa vida juntos, são essenciais pra mim! MUITO OBRIGADA!

Agradeço também às funcionárias da seção de Pós-Graduação em Genética e Evolução, por sempre estar à disposição para nos ajudar, obrigada!

Agradeço à FAPESP pela concessão da bolsa de pesquisa.

Agradeço, enfim, a todos que me auxiliaram a concluir este trabalho.
Obrigada!

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

Albert Einstein

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAM: uma desintegrina e metaloprotease (proteína multimodular)
ALT-C: alternagina-C
ALT-C PEP: peptídeo sintético baseado na seqüência de ALT-C
BCA: ácido bicinconínico
BM: membrana basal
BSA: soro albumina bovina
CAD: doenças das artérias coronárias
CAM: molécula de adesão celular
cDNA: DNA complementar a um mRNA
Da: dalton(s), unidade de massa molecular
DisBa-01: desintegrina de *Bothrops alternatus*
DMEM: meio modificado de Dulbecco
DNA: ácido desoxirribonucléico
dNTP: desoxinucleotídeos trifosfatados
D.O._x: densidade óptica para um comprimento de onda de “X” nm
ECM: matriz extracelular
E. coli: *Escherichia coli*
EGF: fator de crescimento epidérmico
FA: adesão focal
FAK: quinase de adesão focal
FBS: soro fetal bovino
FGF: fator de crescimento de fibroblasto
FGH: fibroblasto gengival humano
FITC: isotiocianato de fluoresceína
GAPDH: gliceraldesído-3-fosfato desidrogenase
GFR: receptor de fator de crescimento
GIST: tumor estromal gastrointestinal
HEPES: ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico
HIV: vírus da imunodeficiência humana
HMEC-1: célula endotelial de microvasculatura de derme humana
HUVEC: célula endotelial de veia de cordão umbilical humano
ICAM: molécula de adesão intercelular
IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
MadCAM: molécula de adesão celular a adressina mucosa
MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno
MIDAS: sítio de adesão dependente de íon metálico
NSCLC: câncer de pulmão não-pequenas células
LB: Luria Bertani (meio de cultura de bactérias)
MOPS: 3-[N-morfolino]propano-ácido sulfônico

mRNA: ácido ribonucléico mensageiro
NEM: N-etil-maleimida
PBS: salina tamponada com fosfato
PDGF: fator de crescimento derivado de plaqueta
PDGFR: receptor de fator de crescimento derivado de plaqueta
PFA: paraformaldeído
PMSF: fenilmetilsulfonilfluoreto
RCC: carcinoma de célula renal
RNA: ácido ribonucléico
rpm: rotações por minuto
RTK: receptor tirosina-quinase
RT-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio
SVMP: metaloprotease de veneno de serpente
VCAM: molécula de adesão celular vascular
VEGF: fator de crescimento endotelial endotélio vascular
VEGFR: receptor de fator de crescimento de endotélio vascular
vWF: fator Von Willebrand

SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS

DCD: ácido aspártico - cisteína - ácido aspártico
ECD: ácido glutâmico - cisteína - ácido aspártico
EILDV: ácido glutâmico - isoleucina - leucina - ácido aspártico - valina
IDG: isoleucina - ácido aspártico - glicina
KGD: lisina - glicina - ácido aspártico
KTS: lisina - treonina - serina
MGD: metionina - glicina - ácido aspártico
MLD: metionina - leucina - ácido aspártico
MVD: ácido aspártico – valina – ácido aspártico
REDV: arginina – ácido glutâmico – ácido aspártico - valina
RGD: arginina - glicina - ácido aspártico
RTS: arginina – treonina - serina
VGD: valina - glicina - ácido aspártico
WGD: triptofano - glicina - ácido aspártico

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. ADESÃO CELULAR	16
1.1.1. Integrinas	18
1.1.2. Integrinas e sinalização.....	25
1.1.2.1. Sinalização <i>outside-in</i>	26
1.1.2.2. Sinalização <i>inside-out</i>	28
1.2. ADESÃO CELULAR E DOENÇAS	30
1.2.1. Metástase.....	30
1.3. ANGIOGÊNESE	35
1.3.1. VEGF	37
1.3.2. Angiogênese integrinas	43
1.3.3. Integrinas e VEGF.....	43
1.3.4. Angiogênese terapêutica.....	44
1.3.4.1. Terapia pró-angiogênica.....	45
1.3.4.2. Terapia anti-angiogênica	46
1.4. VENENOS DE SERPENTES	49
1.4.1. SVMP.....	51
1.4.2. Desintegrinas	55
1.4.2.1. Efeitos de desintegrinas	60
1.4.2.2. Desintegrinas e câncer.....	61
1.4.2.3. Desintegrinas e angiogênese	62
1.4.2.4. Desintegrinas e sinalização celular.....	63
1.4.2.5. Medicamentos derivados do veneno de serpentes.....	64
1.5. ALTERNAGINA-C E DisBa-01	65
2. OBJETIVOS	68
3. MATERIAL E MÉTODOS	69
3.1. OBTENÇÃO DAS DESINTEGRINAS.....	69
3.1.1. Alternagina-C (ALT-C).....	69
3.1.2. DisBa-01	70
3.1.2.1. Expressão.....	70
3.1.2.2. Purificação.....	71
3.1.3. Peptídeo Sintético	72
3.2. DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	72
3.3. LINHAGENS CELULARES.....	73
3.3.1. Cultivo das Células.....	73
3.4. OBTENÇÃO DA ECM PRODUZIDA POR HUVEC	74

3.4.1. ECM para ensaios de inibição da adesão estática.....	74
3.4.2. ECM para ensaios de inibição da adesão sob fluxo.....	75
3.5. ENSAIOS DE PROMOÇÃO DE ADESÃO CELULAR	75
3.6. ENSAIOS DE INIBIÇÃO DE ADESÃO CELULAR.....	76
3.7. ENSAIO DE DESADESÃO/DESCOLAMENTO CELULAR	77
3.8. ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO/VIABILIDADE CELULAR	78
3.9. ENSAIOS DE INIBIÇÃO DE ADESÃO SOB FLUXO.....	79
3.10. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE INTEGRINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	80
3.11. ENSAIOS DE EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL..	80
4. RESULTADOS	85
4.1. ADESÃO E PROLIFERAÇÃO/VIABILIDADE CELULAR.....	86
4.1.1. MDA-MB-231	86
4.1.1.1. Promoção de adesão.....	86
4.1.1.2. Inibição de adesão.....	88
4.1.1.3. Desadesão/descolamento	91
4.1.1.4. Proliferação/viabilidade.....	92
4.1.2. Fibroblastos.....	93
4.1.2.1. Promoção de adesão.....	93
4.1.2.2. Inibição de adesão.....	94
4.1.2.3. Desadesão/descolamento	94
4.1.2.4. Proliferação/viabilidade.....	95
4.1.3. B16F10.....	96
4.1.3.1. Promoção de adesão.....	96
4.1.3.2. Inibição de adesão.....	97
4.1.3.3. Desadesão/descolamento	98
4.2. INIBIÇÃO DE ADESÃO SOB FLUXO.....	99
4.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE INTEGRINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	100
4.3.1. Fibroblastos.....	100
4.3.2. MDA-MB-231	101
4.4. ENSAIOS DE EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL	102
4.4.1. Fibroblastos humanos	104
4.4.2. HUVEC.....	105
4.4.3. HMEC-1	110
5. DISCUSSÃO.....	113
5.1. ADESÃO CELULAR	113

5.1.1. Células de adenocarcinoma MDA-MB-231	115
5.1.2. Adesão sob fluxo.....	125
5.1.3. Células de melanoma murino B16F10	130
5.1.4. Fibroblastos humanos	133
5.2. EXPRESSÃO GÊNICA DE VEGF E VEGFR EM FIBROBLASTOS E EM CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	136
5.2.1. Fibroblastos humanos	137
5.2.2. Células endoteliais HUVEC.....	138
5.2.3. Células endoteliais HMEC-1	140
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	141
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143

RESUMO

As desintegrinas são pequenas proteínas isoladas de veneno de serpente, ricas em cisteína e com um motivo RGD. DisBa-01, uma desintegrina-RGD recombinante de do veneno de *Bothrops alternatus*, inibe metástase de melanoma e a agregação plaquetária em modelos murinos pela interação com integrinas $\beta 3$. Além disso, a desintegrina-RGD inibe a proliferação endotelial *in vitro* e a angiogênese *in vivo*. Alternagina-C (ALT-C), uma desintegrina-like de *Bothrops alternatus* inibe a ligação ao colágeno através da integrina $\alpha 2\beta 1$, a qual desempenha um papel essencial na adesão normal e tumoral a MEC. Esta proteína do veneno também pode modular a angiogênese, onde doses baixas de ALT-C regulam positivamente, ao passo que doses maiores inibem o processo.

Este trabalho apresenta os efeitos de DisBa-01 e ALT-C: 1) na adesão de células de adenocarcinoma mamário MA-MB-231 a proteínas da MEC e MEC subendotelial, sobre condições estáticas e dinâmicas; e na expressão de VEGFR em células endoteliais.

ALT-C inibiu a adesão das células tumorais a quase todos os componentes de MEC testados individualmente e também a MEC. Entretanto, somente uma dose alta da proteína, 10.000nM, teve efeito sobre a MEC em condições estáticas. Sob estresse de cisalhamento, a adesão tumoral foi totalmente inibida por ALT-C 100 e 1.000nM. O fluxo induz a ativação de $\alpha 2\beta 1$. Assim, uma possível ativação das células por estresse de cisalhamento pode ter reforçado a interação com ALT-C.

DisBa-01 não teve efeito na adesão tumoral sob condições estáticas. Por outro lado, sob fluxo a desintegrina-RGD inibiu fortemente a adesão tumoral. Assim, uma possível ativação de $\alpha V\beta 3$ por fluxo pode ter reforçado as interações com DisBa-01.

Sobre a expressão dos VEGFRs, DisBa-01 diminuiu o nível de ambos em quase todas as concentrações testadas. ALT-C em baixas doses, por sua vez, aumentou a expressão do VEGFR-2. Tais resultados podem explicar, ao menos em parte, os efeitos de DisBa-01 e ALT-C na modulação da angiogênese.

Os efeitos anti-adesivos e anti-angiogênicos de ALT-C e DisBa-01 podem ser úteis para o estudo de metástase tumoral, bem como para o desenho de novos agentes terapêuticos que ajam na adesão tumoral nas etapas de extravasamento e invasão.

ABSTRACT

Disintegrins are small cysteine-rich proteins with an RGD motif isolated from viperidae snake venoms. DisBa-01, a recombinant RGD-disintegrin from *Bothrops alternatus* snake venom, inhibits melanoma cell metastasis and also platelet aggregation in murine models by interactions with $\beta 3$ integrin cell receptors. Also, this RGD-disintegrin inhibits human microvascular endothelial cell (HMEC-1) proliferation *in vitro* and angiogenesis *in vivo*. Alternagin-C (ALT-C), a disintegrin-like protein from *Bothrops alternatus*, is a potent inhibitor of the collagen binding to $\alpha 2\beta 1$ integrin which plays an essential role in the adhesion of normal and tumor cells to the extracellular matrix. Also, this protein can modulate angiogenesis where low concentrations of ALT-C positively regulate the formation of new blood vessels, whereas high ALT-C concentrations negatively modulates this process.

This work presents the effects of DisBa-01 and ALT-C: 1) on the adhesion of breast cancer invasive MDA-MB-231 cells to the ECM proteins and to the subendothelial matrix produced by HUVEC (human vascular endothelial cells) under static and dynamic conditions; and 2) on the VEGFRs expression on endothelial cells.

ALT-C inhibited tumoral cell adhesion to almost ECM proteins individually and also to ECM. Only 10000nM ALT-C inhibited tumoral cell adhesion to the HUVEC matrix under static conditions. Under flow, tumoral adhesion were inhibited by 100nM and 1.000nM ALT-C. Flow induces $\alpha 2\beta 1$ activation in endothelial cells and MDA-MB-231 cells expressed high levels of $\alpha 2\beta 1$. Thus, a possible activation of this integrin by the shear stress could enhance its interactions with ALT-C.

DisBa-01 had no effect on the tumoral cell adhesion to HUVEC matrix under static conditions. On the other hand, under flow the RGD-disintegrin strongly inhibited tumoral and platelet adhesion. Thus, a possible activation of $\alpha V\beta 3$ by flow could enhance its interactions with DisBa-01.

About VEGFR expression, DisBa-01 down-regulated VEGFR-1 and VEGFR-2 expression in almost all tested concentrations. ALT-C up-regulates VEGFR-2 expression at lower concentration. These results can explain at least in part the effects of DisBa-01 and ALT-C in angiogenesis.

The anti-adhesives and antiangiogenics ALT-C and DisBa-01 properties may be helpful for the study of tumoral metastasis as well as in the design of new therapeutic agents targeting tumor cell adhesion on extravasation and invasion steps.

1. INTRODUÇÃO

A natureza tem sido fonte de produtos medicinais há muito tempo. Buscando alívio e cura para doenças, extratos de origem vegetal e animal são ingeridos ou aplicados localmente. Entre os produtos de origem animal utilizados para a cura estão os venenos produzidos por diversos organismos, como abelhas, escorpiões, rãs, sapos e serpentes.

Anualmente, 2,5 milhões de pessoas no mundo todo são vítimas de ataques de serpentes, das quais mais de 100.000 são vítimas fatais (LALLOO et al., 1995). Entretanto, se por um lado os ataques de serpentes podem ser mortais, por outro o veneno desses animais é uma fonte natural de diversos componentes com potencial valor terapêutico, tais como peptídeos, proteínas e enzimas.

Os venenos têm sido utilizados no tratamento de diversas condições patofisiológicas na homeopatia, medicina Ayurveda e também na medicina popular. Com o advento da biotecnologia, a eficácia de tais tratamentos está sendo comprovada pelos componentes purificados do veneno e delineando suas propriedades terapêuticas. As pesquisas ajudarão não somente na compreensão das implicações de cada interação, mas também levarão ao desenvolvimento de drogas efetivas dirigidas para funções particulares de proteínas.

Esta tese teve como objeto de estudo duas proteínas do veneno da serpente brasileira *Bothrops alternatus*, ALT-C e DisBa-01, ambas pertencentes ao grupo das desintegrinas, as quais apresentam potencial terapêutico. A seguir serão descritos temas relevantes para a compreensão do estudo aqui apresentado.

1.1.ADESÃO CELULAR

A adesão das células ao seu meio é essencial para a organização e o funcionamento dos organismos multicelulares. As interações possibilitam diversos processos biológicos como migração, organização tecidual e diferenciação, desempenhando papel central no desenvolvimento embrionário, resposta imune, remodelamento e homeostase de tecidos e órgãos (CARLOS & HARLAN, 1994; LOFTUS et al., 1994; SPRINGER, 1994; WAGNER & WYSS, 1994; GUMBINER, 1996; SHATTIL & GINSBERG, 1997; APLIN et al., 1998; SHATTIL et al., 1998). As células podem ligar-se a outras células (EDELMAN, 1983) ou a componentes da matriz extracelular (ECM) (RUOSLAHTI & PIERSCHBACHER, 1986; HYNES, 1999), formando tecidos.

A ECM proporciona suporte e resistência para tecidos e órgãos, além de participar de sua manutenção (REICHARDT, 1999). Trata-se de uma rede complexa de macromoléculas importantes para as funções celulares e arquitetura tecidual (Figura 1). Os componentes da ECM incluem proteínas, polissacarídeos, fatores de crescimento produzidos e secretados principalmente pelos fibroblastos. Estas células participam da organização da ECM (GEIGER et al., 2001). As diferenças na expressão e combinações de colágenos, proteoglicanas e várias proteínas tais como fibronectina e laminina fornecem um ambiente específico morfofuncional dos tecidos.

A composição e as propriedades da ECM variam de acordo com a identidade/localização das células/tecidos que ela circunda e do estágio de desenvolvimento do organismo. No caso dos vasos há uma especialização da ECM formar a membrana basal (BM), que separa o endotélio da ECM. A membrana basal é essencialmente composta por laminina, colágeno tipo IV, glicoproteínas estruturais (nidogênio e fibulina) e proteoglicanas. Já a ECM subjacente é composta por

diversos tipos de colágeno (I, III, V, VI, VIII), microfibrilas, glicosaminoglicanas, além de glicoproteínas como fibronectina, trombospondina, fator de Von Willebrand e vitronectina.

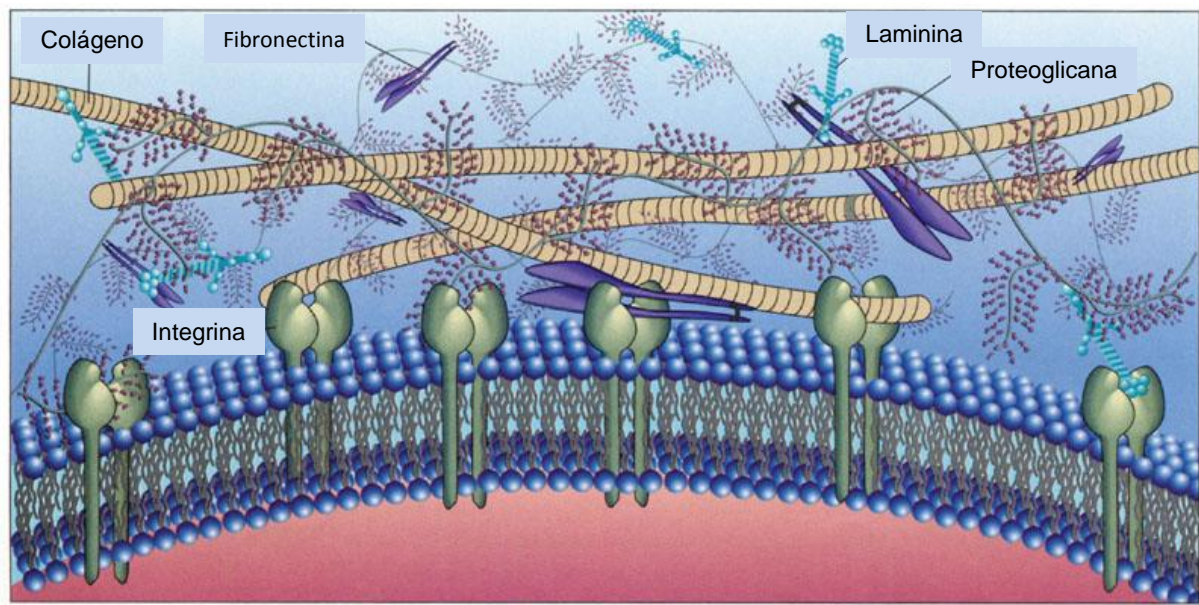


Figura 1 – Organização macromolecular da matriz extracelular (ECM). A ECM é composta por diversas proteínas e polissacarídeos, organizados formando uma rede complexa de macromoléculas, essencial para a manutenção tecidual. Extraído e modificado ([http://219.221.200.61/ywwy/zbsw\(E\)/edetail4.htm](http://219.221.200.61/ywwy/zbsw(E)/edetail4.htm)).

Diversos grupos de moléculas presentes na superfície celular estão envolvidos nos processos adesivos, sendo denominadas de moléculas de adesão celular (CAMs). Tais moléculas podem ser classificadas em seis grupos, de acordo com sua estrutura primária: selectinas (LASKY, 1992), caderinas (TAKEICHI et al., 2000), membros da superfamília de imunoglobulinas (Ig) (BRUMMENDORF & RATHJEN, 1995), adressinas (WAGNER & WYSS, 1994), as integrinas (HYNES, 1987) e as ADAMs (BLOBEL et al., 1992; HORWITZ & HUNTER, 1996; BLACK & WHITE, 1998).

1.1.1. Integrinas

As integrinas são os principais receptores envolvidos nas adesões célula-ECM e também desempenham papéis importantes em algumas adesões célula-célula. As interações das integrinas com seus ligantes são essenciais em diversos processos, como desenvolvimento embrionário, inflamação, homeostase, cicatrização e câncer (RUOSLAHTI & PIERSCHBACHER, 1986; RUOSLAHTI & PIERSCHBACHER, 1987; HYNES, 1992).

A terminologia “integrina” foi aplicada em 1987 para descrever uma família de receptores expressos na membrana celular que integram a ECM ao citoesqueleto intracelular (Figura 2) para mediar a migração e adesão das células (HYNES, 1987).

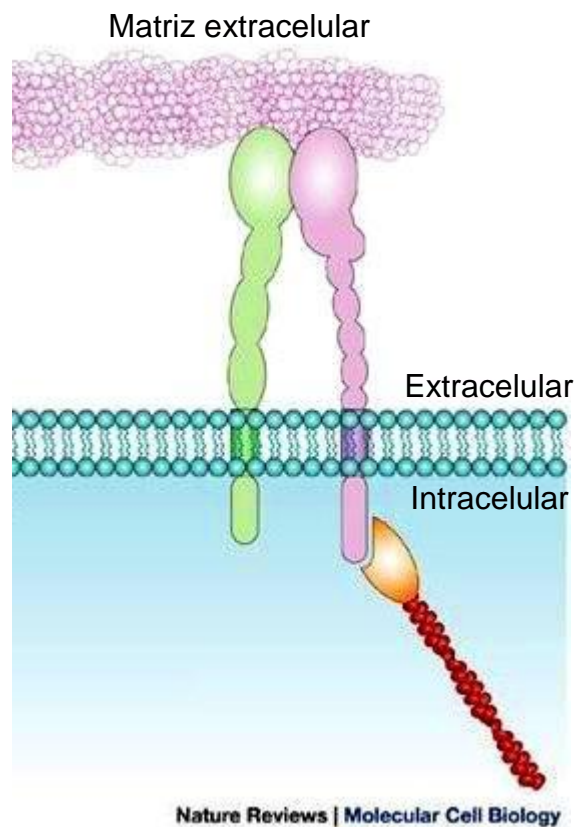


Figura 2 – Integração dos meios intra e extracelular através de integrinas. As integrinas são receptores transmembrana cuja porção citoplasmática interage com proteínas intracelulares, ocorrendo ligações com o citoesqueleto, enquanto o domínio extracelular interage com a ECM. Extraído e modificado (KINBARA et al., 2003).

Tais receptores estão presentes em metazoários e esponjas, não havendo homólogos detectados em procariotos, plantas ou fungos (HYNES, 2002; WHITTAKER & HYNES, 2002; GAHMBERG et al., 2009).

Estruturalmente as integrinas são constituídas por um heterodímero transmembrana, com as subunidades glicoprotéicas α (120 a 180kDa) e β (90 a 110kDa), ligadas não covalentemente entre si (Figura 3). Cada subunidade contém um domínio extracelular (700-900 aminoácidos), um pequeno domínio transmembrana e um domínio citoplasmático menor que o extracelular (20-60 aminoácidos) (HUMPHRIES, 2000; HYNES, 2002).

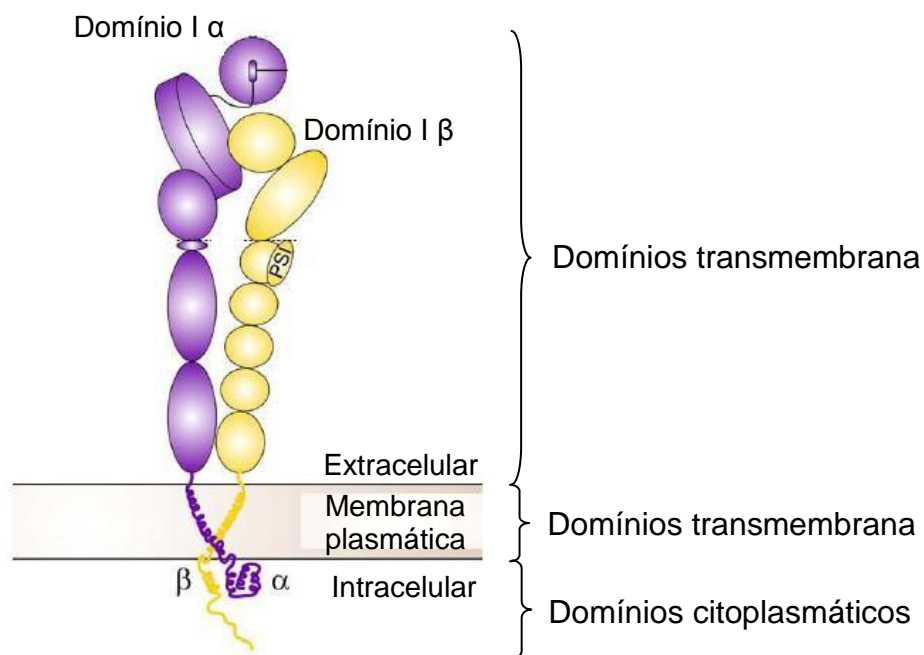


Figura 3 – Estrutura das subunidades das integrinas. As integrinas são receptores heterodímero transmembrana, com as subunidades glicoprotéicas α e β ligadas não covalentemente entre si. Tais subunidades apresentam uma porção extracelular, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático menor que o extracelular. Algumas integrinas apresentam um domínio denominado I (inserido) na extremidade externa da cadeia α ou da cadeia β , importantes nas interações com o ligante. Extraído e modificado (GAHMBERG et al., 2009).

Algumas integrinas apresentam um domínio denominado I (inserido) na extremidade externa da cadeia α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$, $\alpha 11$, αM , αL , αD e αX), sendo a região primária de interação com o ligante nessas integrinas (Figura 3). Nas integrinas que perderam o domínio-I da cadeia α o sítio de ligação na extremidade da porção extracelular é formado por contribuições de ambas as cadeias, α e β (SARANTOS et al., 2005).

O domínio-I pode assumir duas conformações diferentes: conformação “aberta” (alta afinidade) e “fechada” (baixa afinidade). Uma característica importante é a presença da região denominada MIDAS (*Metal Ion Dependent Adhesion Site*), que coordena cátions metálicos divalentes, requeridos para o estado de alta afinidade da integrina (KERN et al., 1993; KAMATA & TAKADA, 1994; CALDERWOOD et al., 1995; TUCKWELL et al., 1996; XIONG et al., 2001; MEYER et al., 2006). Tal região fica constitutivamente ocupada pelo íon magnésio divalente sob condições fisiológicas (MEYER et al., 2006).

Nas integrinas que perderam o domínio-I da cadeia α um domínio tipo I na cadeia β é o sítio primário de ligação nessas integrinas (TUCKWELL & HUMPHRIES, 1997). O domínio tipo I contém três sítios de ligação a metal: o MIDAS, o ADMIDAS (adjacente ao MIDAS) e o LIMBS (*Ligand Induced Metal Binding Site*). No estado fisiológico de baixa afinidade todos os sítios de ligação a metal estão ocupados, sendo o MIDAS por íon magnésio e os outros dois sítios pela ligação com íons cálcio. O magnésio no sítio MIDAS coordena diretamente o resíduo de ácido aspártico dos ligantes RGD (ETO et al., 2002). Além de seu papel regulatório, o íon cálcio no sítio ADMIDAS pode estar envolvido na interação com o ligante (GARNOTEL et al., 2000).

Estudos cristalográficos mostraram que a extremidade de interação com os ligantes extracelulares das integrinas ficam voltados para a membrana, em uma estrutura em forma de “V” (Figura 4) (SARANTOS et al., 2005). Desta forma, foi proposto um modelo em que as integrinas inativas assumem tal configuração, enquanto que na forma ativa a região de ligação se estende de maneira a permitir a interação com os ligantes.

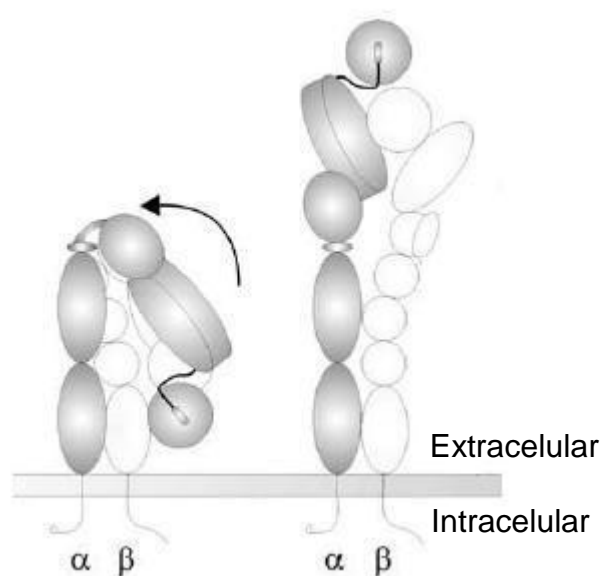
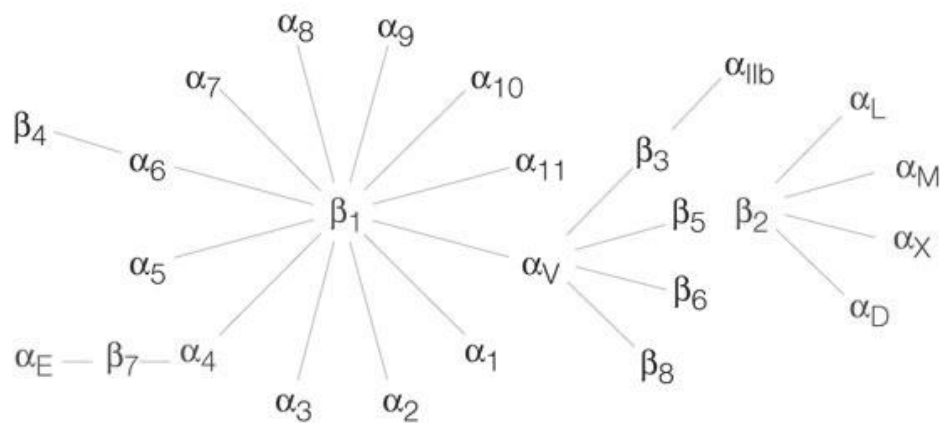


Figura 4 – Regulação estrutural das integrinas. As integrinas podem assumir diferentes conformações associadas a diferentes níveis de afinidade: a conformação em “V” (esquerda), com a extremidade externa voltada para a membrana, apresenta baixa afinidade, enquanto a conformação estendida (direita) apresenta maior afinidade já que permite as interações com os ligantes. Extraído e modificado (GAHMBERG et al., 2009).

Trabalhos posteriores verificaram três conformações para as integrinas: estrutura dobrada, de baixa afinidade; estendida, mas com o sítio de ligação ainda indisponível; e de alta afinidade, com a integrina estendida e sítio de ligação pronto para interagir com o ligante (RUSNATI et al., 1997; TARUI et al., 2001; TARUI et al., 2001; VLAHAKIS et al., 2005; TARUI et al., 2006). A cadeia β é crítica para a conformação e ativação da integrina já que seu domínio tipo I participa da regulação

do domínio I da cadeia α (TARUI et al., 2001; ANDRE et al., 2002; TAVERNA et al., 2005; O'CONNOR, 2007; WEGENER et al., 2007).

Em humanos são conhecidas 24 diferentes integrinas, que surgem de associações entre 18 subunidades α e 8 subunidades β (Figura 5). Algumas subunidades são largamente expressas, enquanto outras são expressas de maneira tecido- ou estágio-dependente (HUMPHRIES et al., 2006). Exemplos da expressão dependente do tipo celular ou de tecidos são: $\alpha_{IIb}\beta_3$, presente em plaquetas; $\alpha_6\beta_4$ em queratinócitos; $\alpha E\beta_7$ em células T, células dendríticas e mastócitos em tecidos mucosos; $\alpha_4\beta_1$ em leucócitos; $\alpha_4\beta_7$ em um subgrupo de células T; e integrinas β_2 é expressa somente em leucócitos (TAKADA et al., 2007). Outras integrinas são encontradas na superfície de diversas células, tal como a $\alpha V\beta_3$, expressa no endotélio.



Nature Reviews | Immunology

Figura 5 – Esquema das diferentes associações entre as subunidades α e β das integrinas. As associações ocorrem entre 18 tipos de cadeias α e 8 tipos de cadeia β , formando pelo menos 24 heterodímeros descritos atualmente. Extraído e modificado (KINASHI, 2005).

A interação das integrinas com os ligantes podem ser específicas de acordo com os tipos de tecidos. A $\alpha_2\beta_1$ plaquetária, por exemplo, é específica para o colágeno, mas também pode se ligar a laminina em outros tipos celulares (HYNES, 1992). Os níveis particulares de integrinas podem ser alterados em diversas doenças, incluindo a progressão do câncer. Normalmente, a integrina β_6 tem sua expressão restrita a células epiteliais no desenvolvimento embrionário, não sendo expressa em tecidos adultos. Elas são expressas em associação com α_V como receptoras para fibronectina, tenascina e vitronectina. A expressão de $\alpha_V\beta_6$ é induzida em células epiteliais durante a cicatrização e em carcinomas de cólon, pulmão, cavidade oral, mama e cervix (JANES & WATT, 2006). Além disso, a especificidade e afinidade de uma integrina podem não ser constantes para o mesmo receptor na mesma célula (HYNES, 1992). A combinação específica das subunidades α e β , seqüências definidas contendo os aminoácidos Asp ou Glu nos ligantes e a presença de cátions divalentes (XIONG et al., 2003) permitem que as células reconheçam e respondam a uma variedade de diferentes ligantes.

As integrinas podem se ligar tanto a moléculas de superfície celular como à proteínas da ECM. As moléculas de adesão que podem interagir com as integrinas são as ICAMs (moléculas de adesão intercelular), as MadCAMs (moléculas de adesão celular a adressina mucosa) e as VCAMs (moléculas de adesão celular vascular). A variedade de proteínas da ECM com as quais as integrinas podem se ligar inclui a fibronectina, a vitronectina, o colágeno, o fibrinogênio, o componente iC3b do sistema complemento, entre outros (SPRINGER, 1994; HUMPHRIES, 2000). Além disso, embora a maior parte das interações das integrinas seja heterotípica, como a ligação de uma integrina a uma proteína da ECM, por exemplo, podem ocorrer também interações heterofílicas, como a ligação $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_3\beta_1$ que

media a adesão intercelular entre queratinócitos (SYMINGTON et al., 1993) e também interações homofílicas entre integrinas $\alpha_3\beta_1$ (SRIRAMARAO et al., 1993).

Algumas integrinas parecem ligar-se a apenas um tipo de ligante, enquanto que outras reconhecem mais de um tipo. Da mesma forma, diversas proteínas da ECM e da superfície celular se ligam a múltiplas integrinas (HYNES, 1987; HUMPHRIES, 1990; ALBELDA, 1993; PLOW et al., 2000; VAN DER FLIER & SONNENBERG, 2001; HUMPHRIES et al., 2006). Análises recentes de estrutura e função de integrinas e seus ligantes revelaram um modo similar de interação molecular que explica a existência de sobreposições nas especificidades de combinações integrina-ligante.

A seqüência RGD da fibronectina foi originalmente identificada como um motivo de ligação a integrina (PIERSCHBACHER & RUOSLAHTI, 1984), assim como seqüências relacionadas encontradas em moléculas da ECM.

Diversas integrinas, como $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, reconhecem a seqüência de aminoácidos RGD presente em várias proteínas diferentes que compõem a ECM, enquanto outras integrinas reconhecem seqüências alternativas, como EILDV ($\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$), REDV ($\alpha_4\beta_1$), IDG ($\alpha_8\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$), entre outras (MIZEJEWSKI, 1999).

As seqüências adesivas reconhecidas por integrinas têm permitido a utilização de moléculas inibidoras que bloqueiam a função desses receptores, como anticorpos monoclonais, peptídeos e pequenas moléculas miméticas, peptídicas ou não (CURLEY et al., 1999). A estrutura RGD, por exemplo, têm servido como base para o desenho de drogas testadas na inibição da função de integrinas para o

tratamento de trombose, inflamação, aterosclerose, osteoporose e câncer (HART et al., 1995).

Embora peptídeos RGD inibam a ligação de ligantes às integrinas com uma especificidade de reconhecimento RGD, estes receptores podem discriminar entre ligantes contendo essa seqüência. A especificidade pode ser determinada pelo contexto da seqüência RGD, como seus resíduos flanqueadores e a conformação tridimensional da seqüência, além de pequenas características individuais (HAAS & PLOW, 1994).

Outros fatores ainda contribuem para a diversidade e complexidade das interações mediadas por integrinas: *splicing* alternativo, modificações pós-traducionais e interações com outras moléculas de superfície celular e intracelular (GREEN et al., 1998; PORTER & HOGG, 1998; DE MELKER & SONNENBERG, 1999).

1.1.2. Integrinas e sinalização

Diversos estudos têm evidenciado que a interação das integrinas com o meio extracelular dispara uma série de eventos de transdução de sinais que modulam comportamentos celulares como proliferação, sobrevivência ou apoptose, forma, polaridade, motilidade, haptotaxia, expressão gênica e diferenciação (TAKADA et al., 2007).

As integrinas participam dos diversos processos celulares através da transdução de sinais celulares em ambas as direções, *outside-in* e *inside-out* (GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999; GINSBERG et al., 2005; LUO et al., 2007; ROSE et al., 2007). A informação de sinalização gerada pelas interações de ligação entre as integrinas e os ligantes é transduzida através da membrana plasmática em uma

variedade de vias de sinalização em um processo denominado sinalização *outside-in*. Reguladores intracelulares, por sua vez, modificam as propriedades externas de ligação da integrina ao ligante em um processo chamado sinalização *inside-out*.

Diversas proteínas do citoesqueleto interagem com domínio citoplasmático da cadeia β das integrinas formam complexos multi-moleculares com proteínas envolvidas na sinalização e com proteínas adaptadoras que fornecem uma conexão ao citoesqueleto, algumas das quais regulam o estado de ativação da integrina (ZAMIR & GEIGER, 2001; HYNES, 2002; DELON & BROWN, 2007; ZAIDEL-BAR et al., 2007). Tais moléculas são ativadas de acordo com o tipo celular e o estímulo recebido pela célula (GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999; COPPOLINO & DEDHAR, 2000; LIU et al., 2000).

1.1.2.1. Sinalização *outside-in*

A ativação *outside-in* envolve mudanças na conformação das integrinas (Figura 6). A interação destes receptores com seus ligantes induz mudanças conformacionais capazes de aumentar a afinidade pelo ligante (ARNAOUT et al., 2005; LUO et al., 2007). A ativação da integrina é acompanhada por várias mudanças conformacionais sutis na região de ligação da integrina que criam um sítio de alta afinidade ao ligante (TAKAGI & SPRINGER, 2002). Subsequentemente, sinais podem ser gerados através de alterações nas estruturas citoplasmáticas da integrina. Tais alterações resultam na formação de *clusters* de integrinas e aumentam sua avidéz pelo ligante (Figura 6). Assim, interações inicialmente fracas entre a integrina e seu ligante podem resultar na formação de grandes agregados de ligante/receptor, um dos principais mecanismos de adesão.

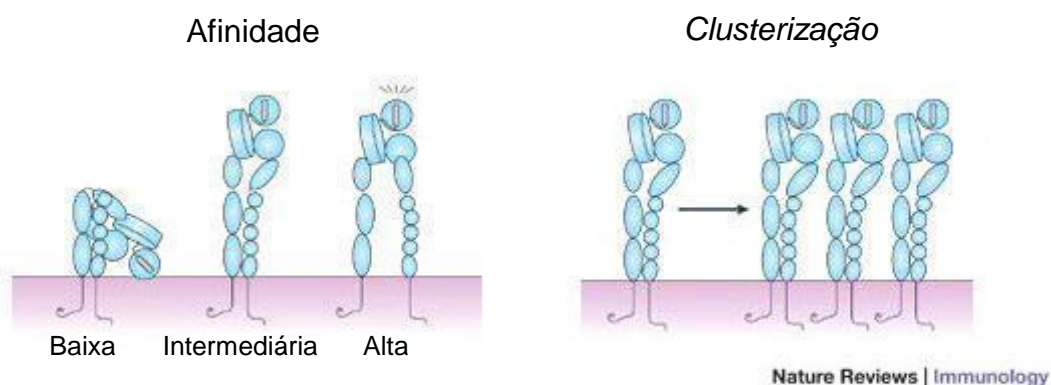


Figura 6 – Ativação e regulação estrutural das integrinas. As integrinas podem assumir conformações com diferentes níveis de afinidade (esquerda): a conformação em “V”, com a extremidade externa voltada para a membrana, apresenta baixa afinidade, enquanto as conformações estendidas apresentam afinidade intermediária ou alta pelos ligantes. Sinais gerados através de alterações nas estruturas citoplasmáticas da integrina podem resultar na formação de *clusters* de integrinas (direita), aumentando a afinidade pelo ligante. Extraído e modificado (KINASHI, 2005).

A ativação, por sua vez, leva à organização de estruturas especializadas de adesão denominadas adesões focais (FAs) (LO & CHEN, 1994). Este complexo inclui proteínas estruturais e de sinalização, como as integrinas, proteínas do citoesqueleto e quinases, que incluem FAK (*focal adhesion kinase*) e Src, entre outras. As FAs asseguram a adesão ao substrato, bem como a localização direcionada do citoesqueleto e dos componentes de sinalização, sendo consideradas organelas de transdução de sinais dependente da adesão (LO & CHEN, 1994).

A maioria das integrinas ativa a FAK, proteína fundamental na sinalização mediada por integrinas (ZACHARY & ROZENGURT, 1992; SCHALLER & PARSONS, 1994). A ativação da FAK e sua fosforilação dependem da ligação da integrina aos seus ligantes (GUAN et al., 1991; KORNBERG et al., 1991; SCHWARTZ et al., 1995), sendo que elas podem ser ativadas pelo domínio citoplasmático da subunidade β da integrina (AKIYAMA et al., 1994; LUKASHEV et

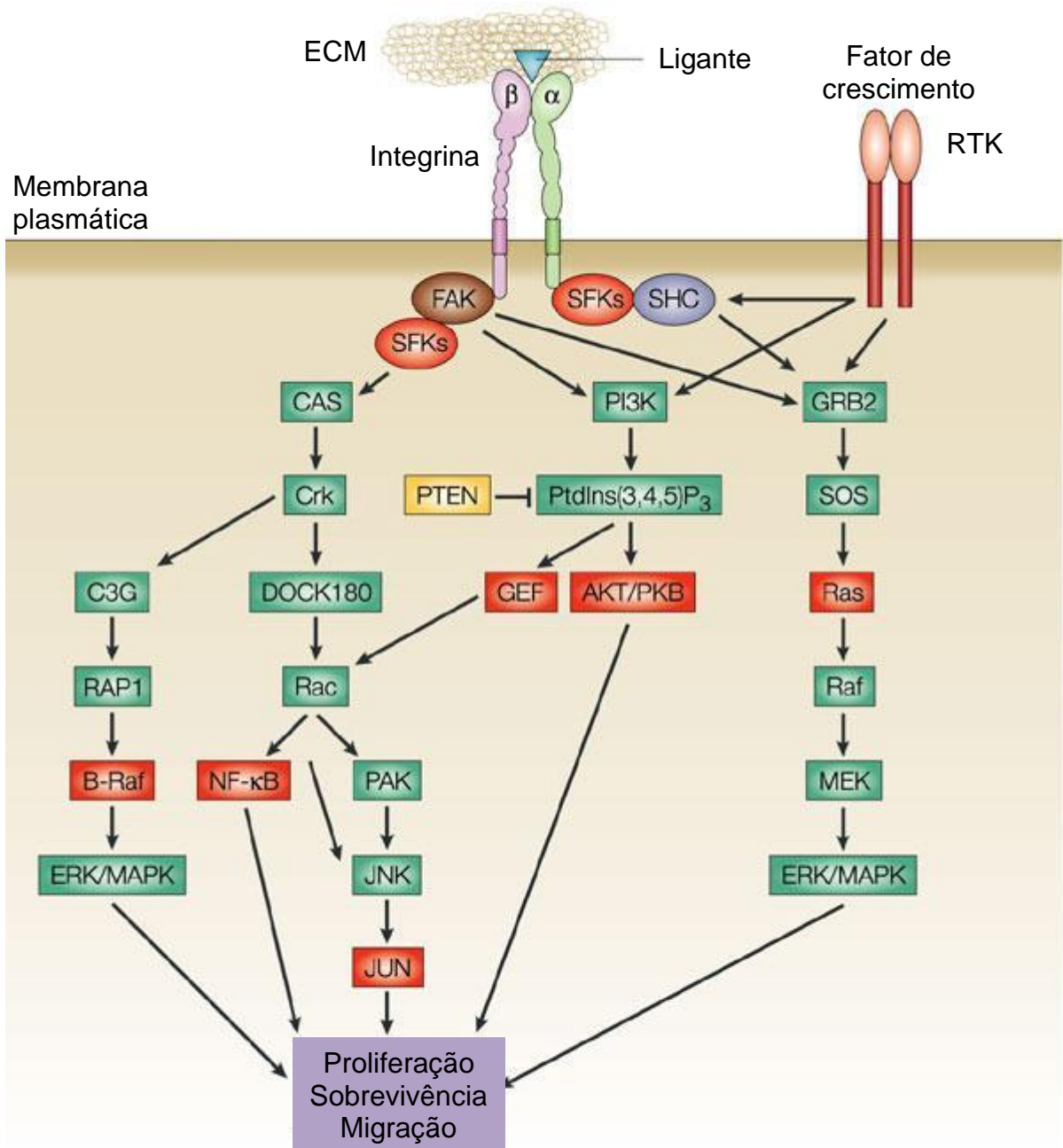
al., 1994) e por interações de proteínas do citoesqueleto associadas a integrina. Uma vez ativada e fosforilada, a FAK se associa a várias moléculas de sinalização, disparando vias de sinalização celular (Figura 7).

1.1.2.2. Sinalização *inside-out*

A ativação das integrinas afeta suas interações com o meio extracelular (GINSBERG et al., 2005; LUO et al., 2007). Assim, os processos de ativação das integrinas devem ser controlados tanto extra como intracelularmente, de forma que esses receptores interajam com seus ligantes e disparem sinalizações de maneira regulada (HUMPHRIES et al., 2003).

As interações entre o domínio citoplasmático das integrinas e os fatores intracelulares regulam a atividade das integrinas e sua interação com o ligante. Diversas proteínas interagem diretamente com o domínio citoplasmático das integrinas, incluindo proteínas do citoesqueleto, proteínas adaptadoras, quinases e mesmo co-ativadores da transcrição. As regiões citoplasmáticas das integrinas assumem conformações diferentes de acordo com as proteínas citoplasmáticas com as quais interagem. Algumas destas proteínas possuem sobreposição do sítio de ligação no domínio citoplasmático das integrinas, de modo que deve haver uma regulação espaço-temporal de tais interações (GAHMBERG et al., 2009).

A subunidade β é o principal sítio para a ligação de moléculas do citoesqueleto e de sinalização, ao passo que a subunidade α possui um papel regulatório. Portanto, deve haver interação entre o domínios citoplasmáticos de ambas as subunidades (VINOGRADOVA et al., 2002).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 7 – Sinalização mediada por integrinas. As interações integrinas-ligantes pode desencadear o recrutamento de diversas proteínas citoplasmáticas, sendo a FAK uma das principais. A FAK ativada e fosforilada se associa a várias moléculas de sinalização, disparando vias de sinalização que culminam na proliferação, sobrevivência e migração celular. Receptores tirosina quinase podem participar de tais processos de sinalização celular. Extraído e modificado (GUO & GIANCOTTI, 2004).

1.2. ADESÃO CELULAR E DOENÇAS

Diversos estudos utilizando camundongos *knockout* têm evidenciado que as integrinas possuem papel crucial em processos como sobrevivência e proliferação celular, cicatrização e tumorigênese (MIRANTI & BRUGGE, 2002; DANEN & SONNENBERG, 2003; GUO & GIANCOTTI, 2004; GINSBERG et al., 2005; LI et al., 2005; JANES & WATT, 2006; LUO et al., 2007).

A pesquisa sobre a adesão celular é um dos campos de mais rápida expansão nas ciências biológicas e biomédicas. Uma das razões para tal crescimento esta na importância da adesão celular em diversos processos celulares normais e também em situações patológicas, incluindo o desenvolvimento de órgãos complexos, a disseminação das células sanguíneas durante a defesa imunológica, desordens inflamatórias e a liberação de células metastáticas do tumor maligno e sua adesão em sítios secundários de colonização. Outra razão é que os recentes progressos metodológicos têm permitido o aprofundamento na compreensão da organização de sistemas celulares complexos e sua regulação. A família das integrinas, em particular, tem recebido bastante atenção devido ao seu papel chave em diversos processos fisiológicos, bem como em situações patológicas (GAHMBERG et al., 2009).

1.2.1. Metástase

A metástase é tida como o auge da progressão neoplásica, sendo a causa de cerca de 90% das mortes em casos de câncer. A cascata metastática é uma série complexa de processos (AUERBACH, 1988; BLOOD & ZETTER, 1990; LIOTTA et al., 1991) que inclui a disseminação das células a partir do tumor primário, migração pela ECM, penetração através da membrana basal, intravasamento, interação

adesiva com o endotélio no órgão-alvo, extravasamento, colonização secundária e neovascularização (Figura 8).

Durante as etapas envolvidas na metástase, a adesão celular é obviamente um evento crítico em que as células tumorais devem interagir com as células adjacentes e com os componentes da ECM e membrana basal, o que ocorre através de receptores tumorais específicos.

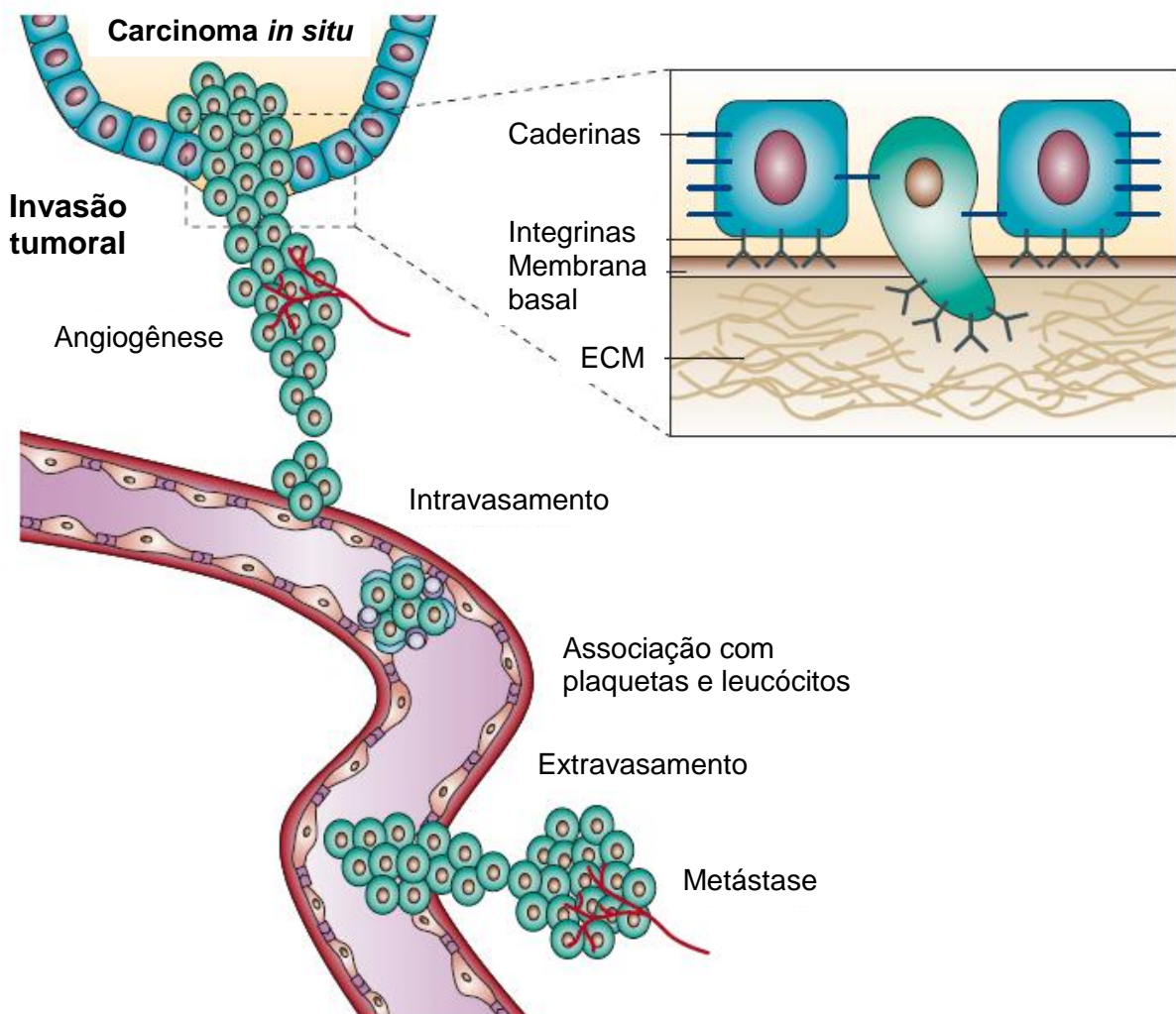


Figura 8 – Cascata metastática. O processo metastático inclui a disseminação das células a partir do tumor primário, migração pela ECM, intravasamento, extravasamento no órgão-alvo, colonização secundária e neovascularização (Figura 8). A adesão celular mediada por integrinas é certamente um evento crítico para a progressão da metástase. Extraído e modificado (GUO & GIANCOTTI, 2004).

Comparada com células normais, a expressão de algumas integrinas é alterada nas células tumorais, sugerindo que diferentes subunidades componentes dessas moléculas possam contribuir positivamente ou negativamente para a progressão tumoral (RUOSLAHTI, 1992). As modificações na expressão e na distribuição das integrinas na superfície celular são específicas para os tipos tumorais. Células tumorais de mama, de próstata e de cólon, por exemplo, apresentam diminuição na expressão de $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, e $\alpha 6\beta 4$, enquanto os osteosarcomas superexpressam $\alpha 2\beta 1$, integrina receptora de colágeno, que desempenha papel importante na formação de metástases (GRINSTEIN et al., 1989; INGBER et al., 1990). As alterações quantitativas e qualitativas na expressão das integrinas são observadas *in vitro* e *in vivo*. Algumas integrinas são expressas ou não durante um período determinado da progressão, enquanto outras são fosforiladas, afetando as propriedades do citoesqueleto e da ligação das integrinas aos ligantes extracelular (KLEIN et al., 1991; FAWCETT & HARRIS, 1992).

A integrina multi-específica $\alpha V\beta 3$ é expressa por diversas células tumorais e sua expressão está envolvida no desenvolvimento tumoral (BROOKS et al., 1994; BROOKS et al., 1995) e na metástase de células de câncer de mama para o osso (PECHEUR et al., 2002), além de desempenhar importante papel em outros tipos de células tumorais, como melanoma, carcinoma de cólon (VONLAUFEN et al., 2001), gliomas e câncer de ovário (ALBELDA et al., 1990; PIGNATELLI et al., 1992).

As integrinas $\beta 1$ apresentaram importante papel na tumorigênese em modelos de cultura celular (ZUTTER et al., 1995; WEAVER et al., 1997; WANG et al., 2002) e, mais recentemente, em um modelo murino transgênico (WHITE et al., 2004). A sinalização pela integrina $\beta 1$ envolve várias etapas, incluindo a ligação a ligantes extracelulares-chave, tais como a fibronectina e a laminina-1. De fato, ligantes da

ECM facilitam e promovem o crescimento de vários tumores sólidos, talvez por oferecerem um microambiente mais permissivo (MUSCHLER et al., 2002; SINGH et al., 2004). A expressão aumentada da integrina $\beta 1$ está correlacionada com a sobrevivência diminuída no câncer de mama. Outras integrinas tais como $\alpha V\beta 3$ e $\alpha 6\beta 4$ são induzidas em células de melanoma altamente metastáticas e na progressão do adenocarcinoma pancreático, respectivamente (BERRIER & YAMADA, 2007).

Os processos metastáticos requerem a sobrevivência de células tumorais circulantes na corrente sanguínea, sua chegada em sítios distantes, extravasamento e sucesso na colonização do novo tecido. Durante seu trânsito na circulação, as células tumorais ficam expostas a forças mecânicas de cisalhamento, proteínas do plasma e células sanguíneas como plaquetas e neutrófilos, tudo podendo afetar sua sobrevivência e extravasamento da parede sanguínea (WEISS, 1990). O extravasamento de células tumorais é um dos eventos mais importantes no processo metastático. No fluxo sanguíneo, a célula tumoral circulante se adere transientemente ao endotélio, seguindo-se uma retração endotelial e adesão tumoral ao subendotélio (ZETTER, 1990). Tal adesão ocorre principalmente através de integrinas, a ligantes adesivos do endotélio, tais como laminina (KITAYAMA et al., 1999), colágeno (HAIER et al., 1999), fibronectina (AKIYAMA et al., 1995), trombospondina-1 (TSP-1) (INCARDONA et al., 1993) e fator Von Willebrand (vWF) (NIERODZIK et al., 1995), e a expressão de alguns desses componentes pode ser modificada pelo *stress* de cisalhamento (THOUMINE et al., 1995).

As plaquetas estão envolvidas na progressão tumoral e podem facilitar a formação de metástases pelo reforço na adesão de células tumorais a ECM subendotelial sob condições de fluxo (BASTIDA et al., 1989; DARDIK et al., 1997).

Alguns estudos sugerem que os agregados plaquetários protegem as células tumorais da atividade citotóxica de agentes naturais como células *killer* (HONN et al., 1992; NIESWANDT et al., 1999). Entretanto, os mecanismos pelos quais as plaquetas auxiliam a metástase ainda não são claramente compreendidos.

A interação entre as células tumorais e a ECM determina não apenas a metástase, mas também influencia outros eventos necessários a formação das metástases, como a mobilidade das células tumorais, a degradação da ECM e a proliferação tumoral. Todos esses processos estão constantemente interagindo entre si e sob a influência de fatores de crescimento produzidos pelo tecido hospedeiro, os quais podem interagir com as integrinas (HONN & TANG, 1992). Um dos processos extremamente importantes para a progressão tumoral em que há interação de integrinas e fatores de crescimento, além de componentes da ECM, é a angiogênese (BIKFALVI & BICKNELL, 2002). Uma vez que a metástase tenha ocorrido, o crescimento tumoral é altamente dependente da habilidade dos tumores induzirem sua própria vascularização (HARLOZINSKA, 2005). Diversos estudos mostram que as integrinas são importantes nas interações complexas requeridas para células tumorais expandirem-se nos tecidos distantes e também na angiogênese necessária para a oxigenação e crescimento tumoral (PARISE et al., 2000; GOEL & LANGUINO, 2004; AKALU et al., 2005). O bloqueio das funções das integrinas pode exercer efeito na resposta angiogênica de células endoteliais, mostrando que tais receptores estão envolvidos na formação de novos vasos (SERINI et al., 2006). Pequenos peptídeos e anticorpos contra as integrinas $\alpha V\beta 3$ e $\alpha V\beta 5$ levaram a inibição da angiogênese e conseqüentemente, a uma rápida regressão tumoral (BROOKS et al., 1994; BROOKS et al., 1994; FRIEDLANDER et al., 1995; KIM et al., 2000).

Além de promover os processos tumorais, a adesão celular media resistência a drogas em múltiplos tipos de câncer, protegendo as células tumorais da morte por radiação, quimioterapia genotóxica ou inibidores de vias de sinalização. Integrinas $\beta 1$ estão envolvidas na resistência a quimioterapia (HAZLEHURST et al., 2000; DAMIANO, 2002) e a radiação (CORDES & BEINKE, 2004; CORDES et al., 2004) em vários tipos de câncer, ilustrando seu papel potencialmente multifacetado como alvo terapêutico e fator preditivo.

1.3. ANGIOGÊNESE

O desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, processo denominado angiogênese, é essencial para o desenvolvimento de órgãos e para a diferenciação durante a embriogênese, bem como para processos normais tais como a cicatrização, regeneração de tecidos e órgãos, e o crescimento cíclico do corpo lúteo e do endométrio (FOLKMAN & KLAGSBRUN, 1987; KLAGSBRUN & D'AMORE, 1991; CARMELIET et al., 1996; FERRARA et al., 1996).

As etapas da angiogênese incluem a ativação das células endoteliais por fatores angiogênicos, proliferação dessas células, migração direcional, remodelamento da ECM circundante, formação e estabilização do tubo vascular.

A regulação da angiogênese é resultante do equilíbrio dinâmico entre fatores pró e anti-angiogênicos (JAIN, 2003). Quando os fatores pró-angiogênicos são produzidos em excesso em relação aos inibidores, o equilíbrio é inclinado a favor do crescimento de vaso sanguíneo, ocorrendo o oposto quando os inibidores estão presentes em excesso aos estimuladores. Em condições normais, o corpo mantém um equilíbrio perfeito entre os moduladores angiogênicos. Nos casos em que o organismo perde o controle sobre a formação de novos vasos sanguíneos, surgem

estados patológicos nos quais a angiogênese pode ser excessiva ou insuficiente (TONINI et al., 2003).

A angiogênese persistente e *up*-regulada está relacionada a patologias como câncer, aterosclerose, artrite reumatóide, retinopatia diabética, psoríase, etc. (FOLKMAN, 1995). Em tais condições, os novos vasos sanguíneos alimentam os tecidos doentes e, no caso do câncer, permitem às células tumorais desenvolverem sua vantagem crítica de crescimento e facilitam a metástase (FOLKMAN, 1987; FOLKMAN, 1990). Os portadores de tais doenças podem se beneficiar da inibição terapêutica da angiogênese. Por outro lado, terapias pró-angiogênicas poderão ser utilizadas em casos onde o processo de formação de vasos é *down*-regulado, desencadeando doenças das artérias coronárias (CAD), falha cardíaca, injúria tecidual, cicatrização retardada de ferimentos, etc. Nestas condições, o crescimento dos vasos sanguíneos é inadequado, o que afeta a circulação sanguínea local e leva invariavelmente ao risco de morte tecidual por necrose.

As diversas moléculas participantes da regulação da neovascularização incluem fatores solúveis, proteases, moléculas de adesão celular e integrinas (BIKFALVI & BICKNELL, 2002). Um conjunto de interações críticas entre ligantes e receptores coordena a angiogênese, nas quais a ligação do VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) ou VEGF-A aos seus respectivos receptores tirosina-quinases (RTKs) VEGFR-1 e -2 se destaca como interação chave (FONG et al., 1995; SHALABY et al., 1995). Fatores adicionais como os FGFs (fatores de crescimento de fibroblastos) e membros da família de PDGFs (fatores de crescimento derivado de plaquetas) também desempenham um papel importante (THOMAS et al., 1985; ISHIKAWA et al., 1989).

1.3.1. VEGF

Há mais de uma década o papel do VEGF na regulação da angiogênese tem sido objeto de intensa investigação (MAGLIONE et al., 1991). Evidências recentes indicam que o crescimento e a maturação de novos vasos são processos altamente complexos e coordenados que requerem a ativação seqüencial de uma série de receptores por ligantes em células endoteliais (YANCOPOULOS et al., 2000; CARMELIET, 2003; JAIN, 2003). Entretanto, a sinalização disparada pela interação do VEGF (ou VEGF-A) com seus receptores é considerada a mais específica e crítica na regulação da neovascularização.

Os VEGFs são glicoproteínas homodiméricas de 34-42 kDa. Este fator de crescimento, descoberto por Dvorak *et al.* por volta de 1980 (SENGER et al., 1983), desempenha papel importante não apenas na angiogênese fisiológica, como também em desordens angiogênicas, incluindo isquemia, inflamação e câncer (FERRARA & HENZEL, 1989; FERRARA et al., 1992; AUTIERO et al., 2003; CARMELIET, 2003).

A família do VEGF inclui pelo menos sete membros: VEGF-A (ou simplesmente VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF (fator de crescimento placentário) e svVEGF (VEGF derivado de veneno de serpentes) (TAKAHASHI & SHIBUYA, 2005; SHIBUYA & CLAEISSON-WELSH, 2006). Todos os membros, exceto VEGF-E e svVEGF, são encontrados em mamíferos.

Um único gene que compreende 8 éxons origina, através de *splicing* do mRNA, isoformas de VEGF (ou VEGF-A) com diferentes números de aminoácidos (VEGF₁₂₁, 145, 165, 189, 206) (FERRARA & DAVIS-SMYTH, 1997), que diferem em propriedades bioquímicas e no padrão de expressão (PARK et al., 1993; GITAY-GOREN et al., 1996; NEUFELD et al., 1996; ROBINSON & STRINGER, 2001).

VEGF₁₂₁ e VEGF₁₆₅ são as únicas isoformas solúveis e também as mais abundantes, sendo VEGF₁₆₅ o estimulador mais poderoso da proliferação de células endoteliais (SOKER et al., 1997). Outras isoformas também foram descritas, com 148, 162 e 183 aminoácidos (VEGF_{148, 162, 183}) e mais recentemente uma variante do VEGF₁₆₅, denominada VEGF_{165b}.

Outros fatores de crescimento e também condições de *stress* como a hipóxia regulam a expressão do VEGF, o que pode ocorrer tanto em células endoteliais como em outros tipos celulares (HARRIS, 2002).

Múltiplos processos envolvendo o endotélio vascular são mediados pelo VEGF, incluindo proliferação (FERRARA & HENZEL, 1989), permeabilidade microvascular (SENGER et al., 1983; SENGER et al., 1990), sobrevivência (ALON et al., 1995; PIERCE et al., 1996; GERBER et al., 1998), adesão e migração (BYZOVA et al., 2000), e indução da expressão gênica (OLSSON et al., 2006), etapas envolvidas na angiogênese (FERRARA & ALITALO, 1999). Outras funções têm sido atribuídas ao VEGF, tais como atividade anti-apoptótica, linfangiogênese (BALDWIN et al., 2002; NAGY et al., 2002), imunossupressão (OHM & CARBONE, 2001; OHM et al., 2003), estímulo e recrutamento células precursoras hematopoiéticas e endoteliais derivadas da medula na angiogênese (LYDEN et al., 2001; RAFII et al., 2002), e regulação da sobrevivência de células-tronco hematopoiéticas (MANN & PLANT, 2002). As diversas atividades do VEGF são, em parte, dependentes dos tipos de células que interagem com ele e do micro ambiente extracelular, permitindo que esse fator exerça funções específicas de acordo com as necessidades de cada tecido (NG et al., 2006).

As atividades multifuncionais de VEGF em células endoteliais e não-endoteliais podem ser explicadas pelas diferenças funcionais ou pela expressão

do VEGFR-1 permanece em discussão. Evidências recentes indicam que suas atividades positivas e negativas conflitantes podem ser devidas, ao menos em parte, ao fato de dependerem do estágio de desenvolvimento e do tipo celular.

A afinidade do VEGFR-1 pelo VEGF é alta, pelo menos uma ordem de magnitude maior que do VEGFR-2 (DE VRIES et al., 1992; SAWANO et al., 1996). Por outro lado, o VEGFR-1 mostra uma fraca autofosforilação da tirosina em resposta ao VEGF em condições fisiológicas, e a ligação desse fator ao VEGFR-1 parece não ativar os sinais *downstream* requeridos para as respostas em células endoteliais tais como proliferação e sobrevivência (DE VRIES et al., 1992; WALTENBERGER et al., 1994; KEYT et al., 1996; RAHIMI et al., 2000). A observação de que o ligante específico de VEGFR-1, PlGF, reforça a atividade do VEGF-A na célula endotelial sugere que o VEGFR-1 possa funcionar como um co-receptor ou como uma “esponja” extracelular para absorver VEGF, impedindo a sinalização em excesso por VEGFR-2, sendo que PlGF desloca o VEGF-A do VEGFR-1 tornando-o disponível para ligar-se ao VEGFR-2 e disparar a sinalização através desse receptor quando necessário (PARK et al., 1994). Camundongos com deleção para o VEGFR-1 morrem *in utero* entre 8,5-9,5 dias devido ao supercrescimento e desorganização dos vasos sanguíneos (FONG et al., 1995; FONG et al., 1999). Por outro lado, camundongos que expressam VEGFR-1 sem o domínio quinase são saudáveis e não apresentam defeitos no desenvolvimento da vasculatura (HIRATSUKA et al., 1998). Assim, embora a ligação dos ligantes ao VEGFR-1 seja essencial, a sinalização através desse receptor, pelo menos durante o desenvolvimento embrionário, é dispensável. O sVEGFR-1, uma forma solúvel do receptor originada por *splicing* alternativo, também inibe a atividade do VEGF (KENDALL & THOMAS, 1993).

O VEGFR-1 também pode ser um regulador positivo crucial da angiogênese sob condições patológicas (CARMELIET et al., 2001; HIRATSUKA et al., 2001; LUTTUN et al., 2002; AUTIERO et al., 2003). Já foi demonstrado que o VEGFR-1 participa da neovascularização associada a patologias como artrite reumatóide, aterosclerose, crescimento tumoral e metástase (CARMELIET et al., 2001; HIRATSUKA et al., 2001; LYDEN et al., 2001; HIRATSUKA et al., 2002; LUTTUN et al., 2002; ZHAO et al., 2004; MURAKAMI et al., 2006). Análises *in vitro* subseqüentes mostraram que a angiogênese observada em condições patológicas é uma consequência da sinalização de VEGFR-1, o qual reforça a sinalização de VEGFR-2 através do complexo heterodimérico VEGFR-1/2 (AUTIERO et al., 2003).

O VEGFR-2 é expresso principalmente em células do endotélio vascular, mas também é encontrado na superfície de algumas células hematopoiéticas que seriam progenitoras das endoteliais (ASAHARA et al., 1999; LYDEN et al., 2001). No endotélio, o VEGF estimula a expressão do VEGFR-2 por um mecanismo de *feedback* positivo (FERRARA & DAVIS-SMYTH, 1997).

O papel deste receptor na angiogênese do desenvolvimento e na hematopoiese é evidenciado pela morte *in utero* entre 8,5-9,5 dias de camundongos com deleção para o VEGFR-2, resultante da perda da vasculogênese e da falha na organização dos vasos (SHALABY et al., 1995). O VEGFR-2 é o principal mediador dos efeitos mitogênico e angiogênico, e da permeabilidade aumentada disparados pelo VEGF. Sob o estímulo deste fator, o VEGFR-2 sofre dimerização e se autofosforila, ativando a via PKC-c-Raf-MEK-MAPK (Figura 10) (TAKAHASHI et al., 2001).

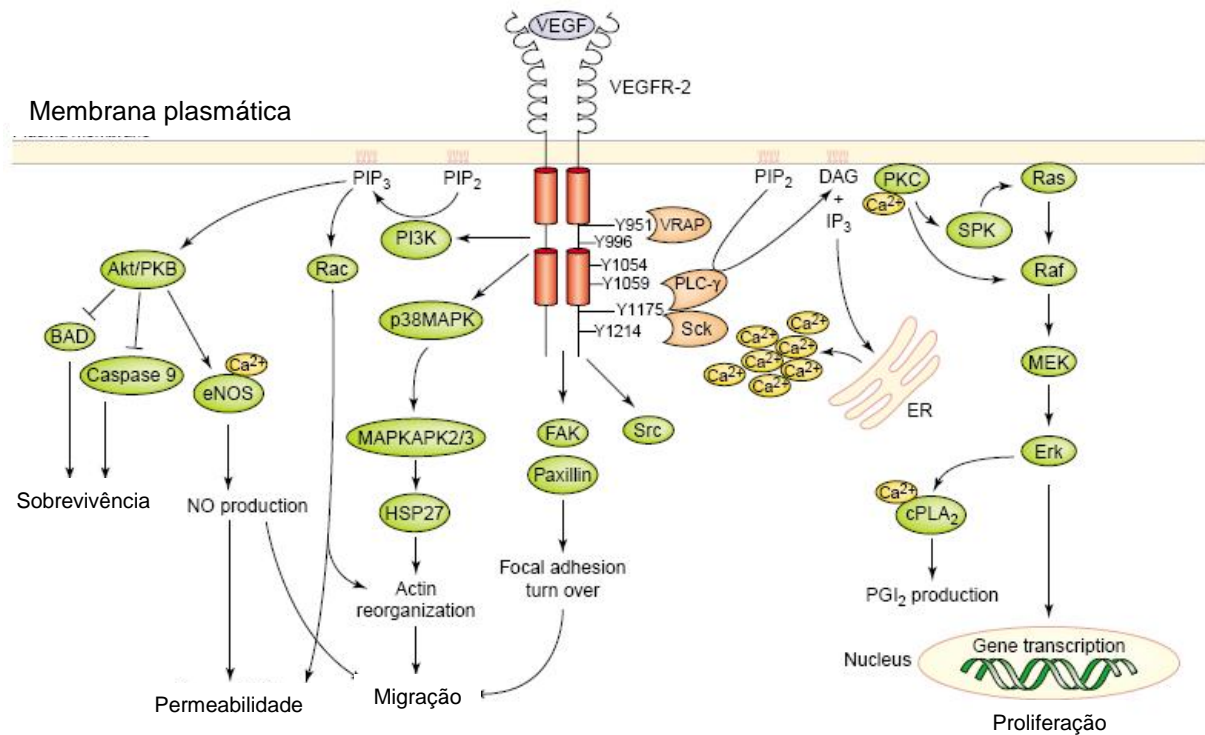


Figura 10 – Sinalização celular através do receptor VEGFR-2. A ligação do VEGF ao domínio extracelular do VEGFR-2 induz sua dimerização e autofosforilação de resíduos de tirosina, desencadeando a ligação de proteínas citoplasmáticas aos resíduos de tirosina. Tais proteínas sofrem fosforilação e ativação. A transdução de sinais resulta em diferentes funções das células endoteliais, tais como sobrevivência, permeabilidade, migração e proliferação. Extraído e modificado (Cross, Dixelius et al. 2003).

O VEGFR-2 tem papel essencial também na angiogênese patológica, como na retinopatia diabética e no câncer. No tecido tumoral, as células tumorais e as do estroma expressam altos níveis de VEGF mas pouco VEGFR-2, enquanto que na vasculatura tumoral a expressão do VEGFR-2 é de 3-5 vezes maior que na normal (PLATE et al., 1994). Isto sugere uma regulação parácrina entre VEGF tumoral e do estroma circundante e o VEGFR-2 das células endoteliais no estímulo da angiogênese.

1.3.2. Angiogênese e integrinas

A angiogênese requer a coordenação de receptores de fatores de crescimento e integrinas (BROOKS et al., 1994; FRIEDLANDER et al., 1995), levando a ativação de sinais *outside-in* em células endoteliais (ELICEIRI et al., 1998; SHORT et al., 1998). Duas vias de angiogênese induzida por fator de crescimento foram identificadas, nas quais o bFGF induz a angiogênese dependente da ligação a integrina $\alpha_V\beta_3$, ao passo que o VEGF induz angiogênese dependente da ligação a integrina $\alpha_V\beta_5$ (FRIEDLANDER et al., 1995). Trabalhos recentes indicam que Src e FAK são ativados por receptores de fatores de crescimento e/ou após a adesão celular mediada por integrinas (PARSONS & PARSONS, 1997; SCHLAEPFER & HUNTER, 1998) Src e FAK também se associam ao domínio citoplasmático de GFRs (SIEG et al., 2000) e após a adesão mediada pela integrina, FAK pode recrutar Src para as FAs levando a ativação da MAPK (WARY et al., 1998). Há evidências que VEGF e outros fatores de crescimento ativam Src quinase, que induz a fosforilação da FAK, facilitando sua associação com a integrina $\alpha_V\beta_5$ *in vivo* e *in vitro*. A deficiência de Src ou o bloqueio de sua atividade inibem a formação de um complexo FAK/ $\alpha_V\beta_5$ induzido por VEGF.

1.3.3. VEGF e integrinas

Estudos revelaram interações entre as integrinas e a sinalização de fatores de crescimento/citocinas em muitos processos celulares (BRAKEBUSCH & FASSLER, 2003). Fatores como PDGF, receptores para insulina, EGF (fator de crescimento epidérmico) e VEGF participam destas interações.

Para responderem aos sinais dos fatores de crescimento, as células devem interagir com a ECM. As integrinas recrutam GFRs (receptores de fator de crescimento) bem como componentes do citoesqueleto, moléculas adaptadoras e tirosina-quinases não-receptoras para sítios de adesão (MIYAMOTO et al., 1996). A importância da sinergia GFR-integrina é ilustrada para a progressão do ciclo celular (ASSOIAN & SCHWARTZ, 2001) e para a migração celular (IVANKOVIC-DIKIC et al., 2000; SIEG et al., 2000). Em fibroblastos e células endoteliais, por exemplo, a adesão às proteínas da ECM induz a ativação parcial do GFR, levando a ativação da MAPK e a sobrevivência celular dependente de ancoragem (MORO et al., 1998). Estudos posteriores revelaram que a FAK interage diretamente com o domínio citoplasmático do GFR, podendo agir como uma ponte entre esse receptor e os componentes de ligação a integrina (SIEG et al., 2000). Além disso, fatores de crescimento, como o VEGF, podem ativar integrinas, aumentando a capacidade de ligação das células a seus ligantes (BYZOVA et al., 2000).

1.3.4. Angiogênese terapêutica

A área que tem como alvo a busca de terapia estimuladoras ou inibidoras da neovascularização está em grande expansão, visando à descoberta de novos compostos ativos que possam ser utilizados como coadjuvantes do processo de formação ou inibição da formação de novos vasos (GRIFFIOEN & MOLEMA, 2000). Estima-se que pelo menos 314 milhões de pacientes no mundo ocidental possam se beneficiar de alguma forma com a terapia pró-angiogênica e que pelo menos 184 milhões de pacientes possam se beneficiar com a terapia anti-angiogênica.

1.3.4.1. Terapia pró-angiogênica

As doenças cardiovasculares estão entre as principais causas mundiais de morte em homens e mulheres, entre todos os grupos étnicos e raças. A disfunção endotelial está envolvida na patogênese de muitas doenças que afetam o sistema cardiovascular, apresentando-se como traço característico na trombose, em vasos ateroscleróticos, artérias sujeitas à injúria mecânica e vasos colaterais que se desenvolvem em resposta a isquemia severa (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; VANHOUTTE & HOUSTON, 1985).

Abordagens disponíveis atualmente para o tratamento de pacientes com doença isquêmica no coração incluem terapia médica ou revascularização coronária por angioplastia ou através de ponte de safena. Entretanto, um número significativo destes pacientes não é candidato a revascularização coronária ou alcançam revascularização incompleta através de tais procedimentos. Desta forma, a descoberta de moléculas candidatas capazes de estimular angiogênese do miocárdio tem causado crescente interesse no uso dessas moléculas para aplicação terapêutica. Experiências clínicas preliminares sugerem que angiogênese terapêutica pode prover fluxo sanguíneo adicional para áreas incompletamente vascularizadas (SCHUMACHER et al., 1998; LAHAM et al., 1999; ROSENGART et al., 1999). A administração perivascular ou intracoronária de VEGF em modelos animais de isquemia miocárdica crônica melhorou o fluxo colateral (BANAI et al., 1994). Métodos clinicamente aplicáveis baseados em cateterismo e métodos cirúrgicos estão sob avaliação (SIMONS et al., 2000; POST et al., 2001). Uma única aplicação de VEGF na superfície intimal de uma artéria que sofreu injúria poderia acelerar a re-endotelização (ASAHARA et al., 1995).

As abordagens terapêuticas atuais apontam para um direcionamento altamente efetivo de fatores angiogênicos para a região isquêmica (SIMONS et al., 2000; RISSANEN et al., 2001). Testes pré-clínicos e clínicos iniciais têm sido realizados, buscando eficácia na geração de novos vasos sanguíneos de estrutura, função e estabilidade adequadas. Os efeitos colaterais locais, bem como os sistêmicos de fatores de crescimento, precisam ser minimizados, mesmo quando são implementadas administrações primariamente locais (EPSTEIN et al., 2001).

1.3.4.2. Terapia anti-angiogênica

A idéia de um fator de crescimento para vasos sanguíneos foi proposta primeiramente por Michelson em 1948. Folkman e seu grupo de pesquisa, no inícios dos anos 1970, foi capaz de mostrar que o crescimento tumoral estava intimamente relacionado ao crescimento de novos vasos tumorais, que, por sua vez, dependem de fatores de crescimento (FOLKMAN, 1972).

O conceito de terapia anti-angiogênica foi formulado há mais de 30 anos por Judah Folkman e desde então, os pesquisadores vêm adquirindo conhecimentos essenciais nos mecanismos biológicos da angiogênese.

Estudos clínicos mostram a importância do VEGF em doenças humanas. Altos níveis de VEGF no soro em pacientes com câncer de pulmão em pré-tratamento estão relacionados à baixa resposta a quimioterapia convencional e a baixa taxa de sobrevivência (SALVEN et al., 1998). Assim, diante dos papéis deste fator de crescimento angiogênico, diferentes estratégias têm sido desenhadas para inibir sua função em processos patológicos. Estudos demonstraram que anticorpos específicos para VEGF são capazes de interromper seus efeitos angiogênicos,

suprimindo significativamente o crescimento tumoral e reduz sua massa em até 96% em camundongos (KIM et al., 1993; BORGSTROM et al., 1999).

Um dos anticorpos humanizados que age diretamente com o VEGF-A é o bevacizumab. Tal molécula tem sido recomendada como a primeira linha de terapia para pacientes com carcinoma coloretal metastático e em subgrupos de pacientes com carcinoma de pulmão metastático avançado. Em 2007, o Bevacizumab foi aprovado na Europa para o tratamento de câncer renal e de mama.

Outra abordagem é o acoplamento de uma toxina ao próprio VEGF. Quando partes ativas da toxina de difteria (DT390) são ligadas ao VEGF₁₆₅ ou VEGF₁₂₁, a molécula quimérica exerce efeitos tóxicos altamente seletivos em células endoteliais, diminuindo a velocidade de crescimento tumoral em modelo de sarcoma de Kaposi (ARORA et al., 1999).

A interação do VEGF com seus receptores também se constitui em um alvo para as terapias anti-angiogênicas. A administração de VEGFR-1 solúvel purificado bloqueia a proliferação de células endoteliais, pois esse receptor se liga ao VEGF com alta afinidade e impede que haja a transdução de sinais proliferativos disparada pela ligação desse fator de crescimento ao VEGFR-2 (HIRATSUKA et al., 1998). A transfecção de células tumorais com cDNA codificante de VEGFR-1 solúvel nativo truncado inibe significativamente sua implantação e crescimento no pulmão de camundongos após a injeção intravascular. A tabela 1 mostra alguns dos inibidores de receptores tipo tirosina quinase que estão fase de desenvolvimento.

Tais abordagens são um ponto de partida promissor para o desenvolvimento de novas drogas anti-angiogênicas, pois elas esclarecem interações críticas entre os fatores de crescimento angiogênicos e seus receptores.

Inibidor	Nomes alternativos	Companhia	Alvo	Fase na triagem clínica
Sunitinib	Sutent®, SU11248	Pfizer	VEGFR2, PDGFR α e β , c-KIT, Flt3, RET ^{90,91}	Fase III: câncer de mama, coloretal e de pulmão
Sorafenib	Nexavar®, BAY 43-9006	Bayer HealthCare Pharmaceuticals and Onyx Pharmaceuticals	VEGFR2 e VEGFR3, Raf, PDGFR β , Flt-3 e c-KIT ²⁷	Fase III: NSCLC e melanoma
Pazopanib	Armala™, GW786034	GlaxoSmithKline	VEGFR1-3, PDGFR α e β , c-KIT ⁹²	Fase I: câncer coloretal Fase II: NSCLC, câncer ovariano, sarcoma Fase III: RCC
Axitinib	AG-013736	Pfizer	VEGFR1-3, PDGFR β , c-KIT ⁹³	Fase II: pulmão, GISTs, tireóide, mama e RCC Fase III: pancreático
Cediranib	Recentin™, AZD2171	Astrazeneza	VEGFR1-3, PDGFR α e β , c-KIT ⁹⁴	Fase III: glioblastoma recorrente Fase II/III: NSCLC, câncer coloretal
Vatalanib	PTK787, ZK222584	Novartis	VEGFR1-3, PDGFR α e β , c-KIT ³⁴	Fase II: tumores neuroendócrinos metastáticos, tumores de cérebro e do sistema nervoso central, sarcoma
Vandetanib	Zactima™, ZD6474	Astrazeneca	VEGFR1-3, PDGFR β , EGFR e RET ^{30, 95}	Fase III: NSCLC Fase II: câncer de tireóide
Brivanib alaninate	BMS-582664	Bristol-Myers Squibb	VEGFR1-3, fgfr1-3 ⁹⁶	Fase III: câncer coloretal Fase II: carcinoma hepatocelular
BIBF 1120	Vargatef™	Boehringer Ingelheim	VEGFR1-3, PDGFR α e β , FGFR1-3, Flt3, Scr, Fyn, Lck ⁹⁷	Fase III: NSCLC

Tabela 1 – Inibidores de quinases em uso clínico e desenvolvimento.

Abreviações: FGFR, receptor de fator de crescimento de fibroblasto; GIST, tumor estromal gastrointestinal; NSCLC, câncer de pulmão não-pequenas células; PDGFR, receptor de fator de crescimento derivado de plaqueta; RCC, câncer de célula renal.

Fonte: (HEATH & BICKNELL, 2009)

1.4. VENENOS DE SERPENTES

As serpentes surgiram há cerca de 130 milhões de anos, quando divergiram dos lagartos (KOCHVA, 1987). Atualmente existem cerca de 2.700 espécies em quase todas as partes do planeta, das quais 2% são venenosas. No Brasil, há aproximadamente 260 espécies catalogadas de serpentes, das quais cerca de 40 são venenosas.

As espécies de serpentes venenosas são classificadas em quatro famílias: Viperidae; Atractaspididae; Elapidae e Colubridae. Cada família apresenta serpentes com venenos cujas famílias de proteínas são compartilhadas. As diferenças encontradas nos venenos de serpentes de diferentes famílias estão nas sequências de aminoácidos e na abundância das proteínas, contribuindo para as diferenças nas atividades biológicas dos venenos individualmente. Em muitos casos, toxinas homologas são encontradas no veneno de todas as serpentes nas quatro famílias.

Os venenos de serpentes são produtos de glândulas secretórias especializadas localizadas acima do maxilar das serpentes venenosas. Assim como a maioria das proteínas secretadas por glândulas, as proteínas do veneno são sintetizadas no citoplasma das células secretórias da glândula, transferidas para o retículo endoplasmático, de onde vão para o aparato de Golgi, finalmente sendo transportadas por grânulos secretórios para o lúmen da glândula venenífera (WARSHAWSKY et al., 1973).

Os venenos de serpentes são complexas misturas compostas principalmente de proteínas, nucleotídeos e íons inorgânicos (FRIEDERICH & TU, 1971; MARKLAND, 1998; FRY, 1999). A maior parte dos venenos é composta por proteínas e peptídeos com variadas atividades biológicas, compreendendo cerca de 90 a 95% do peso seco do veneno (MARKLAND, 1998).

A composição quantitativa e qualitativa dos venenos varia não apenas entre as famílias de serpentes, mas em todos os níveis, passando por gênero, espécie, subespécie e mesmo entre serpentes da mesma espécie (PINTO et al., 2007). Fatores como a idade da serpente, habitat, período sazonal, dieta e dimorfismo sexual também podem alterar a composição do veneno das serpentes (CHIPPAUX et al., 1991) (DALTRY et al., 1996).

Os compostos tóxicos produzidos pelas serpentes incluem enzimas (acetilcolinesterases, ADPases, fosfolipases, hialuronidases) e compostos que atuam na hemostasia (metaloproteases e serinoproteases). Proteínas não-enzimáticas tais como as desintegrinas e peptídeos potencializadores de bradicinina também interferem na hemostase (BJARNASON & FOX, 1994; MARSH, 1994; KAMIGUTI et al., 1996; SUHR & KIM, 1996; MATSUI et al., 2000).

Os efeitos biológicos dos venenos são complexos pela ação distinta dos diferentes componentes do veneno, além de poderem agir em conjunto com outras moléculas do veneno. As toxinas desempenham diversos papéis adaptativos que incluem a imobilização e morte da presa, auxiliando também na digestão da mesma. A ação sinérgica de proteínas do veneno pode reforçar suas atividades (FRIEDERICH & TU, 1971; MARKLAND, 1998; CALVETE et al., 2005).

A complexidade dos venenos de serpentes é devida não somente a estrutura genômica, mas também nos processos de transcrição e tradução, envolvendo também modificações pós-traducionais. A sofisticação dos métodos para análise do proteoma dos venenos de serpente tem permitindo tanto a identificação de diferenças nos venenos de espécies diferentes, auxiliando nos estudos taxonômicos e evolutivos das serpentes e seus grupos protéicos, além de permitir o aprofundamento na compreensão dos processos de produção e modificação dos

componentes do veneno, bem como o papel dos componentes no envenenamento. Atualmente mais de 55 gêneros de serpentes tiveram seu proteoma do veneno analisado (FOX & SERRANO, 2008; FOX & SERRANO, 2008).

De acordo com seu principal efeito no envenenamento os venenos podem ser classificados como neurotóxicos, causando morte por bloqueio da transmissão neuromuscular; ou hemorrágicos, os quais causam choque, coagulação intravascular, hemorragia local e sistêmica, edema e necrose tecidual, devido à ação de toxinas hemorrágicas e mionecróticas (BJARNASON & FOX, 1994).

1.4.1. Metaloproteases de veneno de serpentes - SVMP

As proteases isoladas do veneno de serpentes podem ser classificadas funcionalmente em (1) serinoproteases e (2) metaloproteases (SVMPs – metaloproteases de veneno de serpentes). Entre os efeitos desencadeados por estas proteases estão as atividades pró-coagulante (SELISTRE & GIGLIO, 1987), hemorrágica (BJARNASON & TU, 1978; SELISTRE et al., 1990; JOHNSON & OWNBY, 1993), anticoagulante (CHEN & RAEL, 1997), fibrinolítica (GUAN et al., 1991), ativadora de plaquetas (SERRANO et al., 1995) e inibidora de agregação plaquetária (KINI & EVANS, 1991; FUJIMURA et al., 1995).

As metaloproteases de veneno de serpentes (SVMPs) são enzimas com múltiplos domínios capazes de agir no sistema hemostático. Nos últimos anos estas proteases têm sido objeto de diversos estudos por sua relevância patológica (JOHNSON & OWNBY, 1993; RUCAVADO et al., 1999; GUTIERREZ & RUCAVADO, 2000; RODRIGUES et al., 2004) e também por potenciais aplicações terapêuticas (TRIKHA et al., 1994; KANG et al., 1999; SELISTRE-DE-ARAUJO et al., 2000; TOOMBS, 2001; SWENSON et al., 2004).

As SVMPs são classificadas de acordo com a organização de seus multidomínios nas classes P-I a P-III (Figura11) (FOX & SERRANO, 2008). SVMPs da classe P-I consistem somente do domínio metaloprotease. As metaloproteases contendo um domínio desintegrina adicionado ao C-terminal do domínio catalítico pertencem a classe P-II, a qual foi subdividida em P-IIa-d de acordo com o processamento para liberação do domínio desintegrina. Na subclasse P-IIa o domínio desintegrina é liberado da forma madura da proteína, enquanto os precursores P-IIb permanecem com todos os domínios após a maturação; a subclasse P-IIc compreende as SVMPs diméricas, sem a liberação do domínio desintegrina, assim como as P-IIb; as proteases da classe P-IId originam as desintegrinas homodiméricas liberadas do restante da proteína, enquanto a subclasse P-IIe origina as desintegrinas heterodiméricas, também processadas do restante da estrutura da metaloprotease. Uma classe denominada D-I foi criada para precursores que possuem o domínio desintegrina porém não o domínio catalítico.

As SVMPs da classe P-III apresentam um domínio tipo desintegrina e um domínio rico em cisteína adicionados C-terminalmente ao metaloprotease. Assim como a classe P-II, a classe P-III apresenta as subclasses P-IIIa-c agrupando as metaloproteases de acordo com o processamento da forma madura. Na subclasse P-IIIa não há liberação dos domínios adicionados ao domínio catalítico; as metaloproteases da subclasse P-IIIb liberam o domínio tipo desintegrina juntamente com o rico em cisteína; na subclasse P-IIIc os precursores originam as SVMPs diméricas sem a liberação dos domínios desintegrina e rico em cisteína. Uma subclasse P-IIId inclui os precursores que possuem um domínio tipo lectina ligado ao rico em cisteína por pontes dissulfeto. Tais precursores foram anteriormente classificados como classe PIV (BJARNASON & FOX, 1994; HITE et al., 1994). O

critério para formular esta nova classificação das SVMPs foi baseado na presença ou não de domínios adicionais ao catalítico através da análise de mRNA e proteínas isoladas do veneno. Sem a presença de mRNA para a classe PIV, sugere-se que a estrutura de tais SVMPs seja devida a modificações pós-traducionais da estrutura P-III (FOX & SERRANO, 2008).

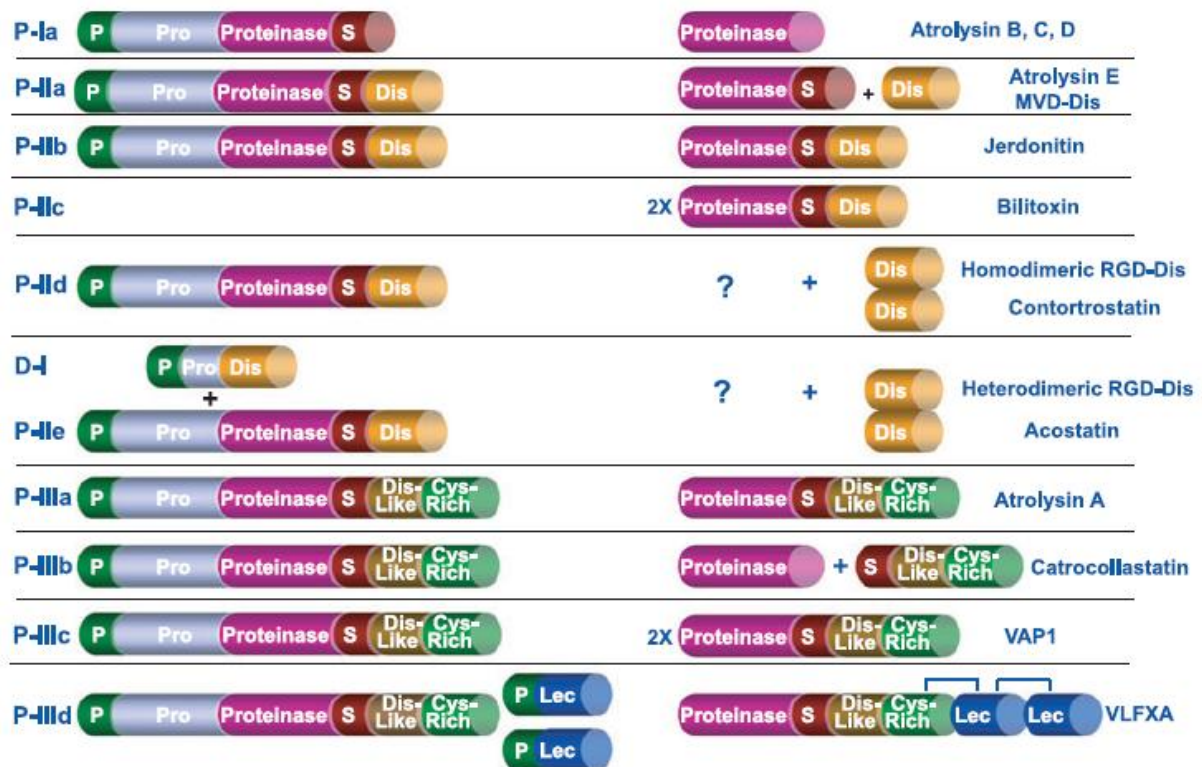


Figura 11 – Esquema das classes de SVMP. As SVMPs são produzidas na forma de precursores inativos, com os membros apresentando um peptídeo sinal de secreção (P), um pró-domínio (Pro), um domínio catalítico metaloprotease (Proteinase) e uma região espaçadora (S). As SVMPs pertencentes ao grupo P-II apresentam um domínio desintegrina adicional (Dis), enquanto as do grupo P-III possuem os domínios adicionais desintegrina-like (Dis-Like) e rico em cisteína (Cys-Rich). Algumas SVMPs do grupo P-III possuem, ainda, um domínio tipo lectina (Lec) (FOX & SERRANO, 2008).

As SVMPs são sintetizadas e armazenadas na glândula venenífera na forma de zimogênios ou precursores inativos. O peptídeo sinal destas metaloproteases

possui cerca de 18 aminoácidos os quais servem como seqüência sinal para determinação de sua localização sub celular ou secreção (SHAH et al., 1997).

O pró-domínio é composto de uma sequencia de 200 aminoácidos altamente conservada entre as SVMPs. Ele interage com o domínio catalítico, modulando sua atividade enzimática Após a secreção da glândula, o processamento proteolítico converte o zimogênio para a enzima ativa, mecanismo de ativação tipo “Cys-switch” (GRAMS et al., 1993; HITE et al., 1994; NISHIDA et al., 1995). O processamento proteolítico dos precursores de SVMPs ocorre nas vesículas secretórias liberadas para o lúmen da glândula venenífera (FOX & SERRANO, 2008).

O domínio metaloprotease ou catalítico é composto de aproximadamente 215 aminoácidos, com atividade endoprotease dependente de metal, no caso zinco, o qual interage com o motivo de ligação HEBxHxBGBxHD (B: resíduo hidrofóbico; x: qualquer resíduo) (RAMOS & SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006).

Entre os domínios catalítico e desintegrina ou tipo desintegrina há uma sequencia denominada peptídeo espaçador, definido como um segmento de 13-15 resíduos, que pode ser liberado de alguns precursores. Entretanto, desintegrinas maiores e proteínas tipo desintegrina podem apresentar o peptídeo espaçador, cujo resíduo extra de cisteína forma uma ponte dissulfeto com o domínio rico em cisteína. Possivelmente ele estaria envolvido na resistência proteolítica de algumas SVMPs (FOX & SERRANO, 2005).

Os domínios desintegrina e tipo desintegrina possuem de 41-100 resíduos e pontes dissulfeto características. Diversos estudos relataram que tais domínios interagem fortemente com as integrinas, disparando processos biológicos mediados por esses receptores (GOULD et al., 1990; SCARBOROUGH et al., 1993; MORRIS et al., 1995; KANG et al., 1999; SOUZA et al., 2000; COMINETTI et al., 2003;

MARIANO-OLIVEIRA et al., 2003; COMINETTI et al., 2004). A maioria das desintegrinas origina-se do processamento de SVMPs P-II e apresentam no motivo tripeptídico RGD de adesão (RAHMAN et al., 2000; OKUDA & MORITA, 2001; YAHALOM et al., 2002). Os domínios tipo desintegrina liberados a partir das SVMPs P-III apresentam sequências alternativas ao motivo RGD, substituindo-o por tripeptídeos como DCD ou ECD (PAINE et al., 1992; HITE et al., 1994; ZHOU et al., 1995; SELISTRE DE ARAUJO et al., 1997; SOUZA et al., 2000). Desintegrinas com motivos MLD e KTS e diversas desintegrinas homo e heterodiméricas também são descritas (CALVETE, 2005; MARCINKIEWICZ, 2005).

O domínio rico em cisteína possui 112 resíduos e assim como os domínios desintegrina e tipo desintegrina, apresenta alta quantidade de cisteínas, como sua designação sugere. Estudos mais recentes indicam que este domínio possui papel importante nos efeitos tóxicos das SVMPs (IBA et al., 1999; JIA et al., 2000) bem como nos efeitos apresentados pelas proteínas contendo os domínios tipo-desintegrina e rico em cisteína (JIA et al., 2000; KAMIGUTI et al., 2003; SERRANO et al., 2005; SERRANO et al., 2006; PINTO et al., 2007; SERRANO et al., 2007).

1.4.2. Desintegrinas

Em 1983 pesquisadores verificaram que o veneno de algumas serpentes contém peptídeos capazes de inibir fortemente a agregação plaquetária (OUYANG et al., 1983), com a purificação do primeiro de tais peptídeos, denominado trigramina, ocorrida apenas em 1987 (HUANG et al., 1987). A atividade inibitória ocorreu através da interação entre a trigramina e a integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ presente na superfície plaquetária, impedindo sua ligação ao fibrinogênio. Devido a sua interação

com integrinas, os peptídeos apresentando tal atividade foram denominados “desintegrinas” (GOULD et al., 1990).

As desintegrinas compreendem uma família de pequenos polipeptídeos solúveis (40-100 aminoácidos, 7-10kDa) originalmente descritos em venenos de serpentes, ricos em cisteínas, não enzimáticos e capazes de interagir com as integrinas presentes na superfície celular (DENNIS et al., 1990; GOULD et al., 1990; NIEWIAROWSKI et al., 1994; HUANG, 1998; MCLANE et al., 1998).

As desintegrinas originam-se a partir do processamento proteolítico de precursores maiores contendo um domínio metaloprotease, conforme descrito anteriormente na seção SVMP (BJARNASON & FOX, 1994; YAMADA et al., 1999). Entretanto, alguns trabalhos mostraram que pode haver uma origem alternativa em alguns casos. Pelo menos quatro desintegrinas apresentam precursores com a sequência sinal, o pró-domínio, mas não o domínio catalítico, como é o caso da acostatina (*Agkistrodon contortrix contortrix*), piscivostatina (*Agkistrodon piscivorus piscivorus*) (OKUDA et al., 2002) e gabonina-1 e -2, de *Bitis gabonica* (FRANCISCHETTI et al., 2004).

As desintegrinas, inicialmente descritas como potentes inibidores da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, receptora para fibrinogênio plaquetário, são frequentemente inibidores de outras integrinas RGD-dependentes, incluindo $\alpha_V\beta_3$ e $\alpha_5\beta_1$ (DANEN et al., 1998; WIERZBICKA-PATYNOWSKI et al., 1999).

Algumas desintegrinas não possuem a sequência adesiva RGD, mas sim o motivo XXCD e também são capazes de interagir com as integrinas (JIA et al., 1997). Tais proteínas, denominadas tipo desintegrina (desintegrina-*like*), são originadas do processamento das SVMP da classe PIII, gerando-se proteínas maiores que possuem um domínio rico em cisteína além do desintegrina-*like*. Assim,

estas proteínas possuem massas moleculares maiores que as desintegrinas-RGD, em torno de 23-32kDa (JIA et al., 1997). As desintegrinas-*like* mostram-se potentes inibidoras da ligação do colágeno a um de seus principais receptores, a integrina $\alpha_2\beta_1$ (SOUZA et al., 2000).

Existe, ainda, um grupo de desintegrinas formadas pela união de duas cadeias ligadas por pontes dissulfeto, sendo denominadas desintegrinas diméricas (MARCINKIEWICZ et al., 1999). Tal grupo foi mais recentemente descoberto e inclui desintegrinas com cadeias idênticas, homodiméricas, e as que possuem cadeias diferentes entre si, heterodiméricas. Uma característica interessante das desintegrinas diméricas é que o motivo adesivo de cada cadeia pode ser diferente nas heterodiméricas. As desintegrinas heterodiméricas exibem maior variabilidade nas seqüências de aminoácidos de seus sítios ativos (CALVETE et al., 2003). Algumas possuem a seqüência RGD em ambas as subunidades (GASMI et al., 2001), enquanto em outras a seqüência correspondente em uma subunidade pode ser MGD (MARCINKIEWICZ et al., 1999), KGD (NIKAI et al., 2000), WGD (CALVETE et al., 2002), e MLD e VGD (MARCINKIEWICZ et al., 1999; MARCINKIEWICZ et al., 2000). Assim, a diversidade estrutural apresentada pelas desintegrinas diméricas está diretamente associada a seletividade pelas integrinas nos membros desse grupo (CALVETE et al., 2000).

Os primeiros estudos estruturais de desintegrinas revelaram que o motivo RGD localiza-se no topo de um “loop” saliente (SMITH et al., 1996; FUJII et al., 2003). Em desintegrinas diméricas, os “loops” se localizam opostamente um ao outro, permitindo a reunião (“clustering”) de integrinas devido a interações com as duas cadeias simultaneamente (CALVETE et al., 2003).

Nas desintegrinas-RGD, o resíduo conservado de aspartato foi apontado como responsável pela ligação às integrinas, enquanto os outros dois resíduos do motivo (RG, MG, WG, ML, VG) podem fornecer a especificidade (CALVETE et al., 2003). Estudos do motivo KTS, que não apresenta o resíduo de glicina, também apontaram que o resíduo da posição central estaria envolvido no reconhecimento de integrinas e não na ligação propriamente dita (MORENO-MURCIANO et al., 2003).

Além da composição do motivo de ligação, outros fatores contribuem para o reconhecimento e interação entre as desintegrinas e as integrinas. Os aminoácidos flanqueando o motivo tripeptídico de reconhecimento de integrinas possuem papel essencial nas características de interação com as integrinas (PFAFF et al., 1994; LU et al., 1996; MCLANE et al., 1996; JIA et al., 1997). Outros resíduos presentes no “loop” porém mais distantes do motivo de ligação também são importantes na modulação da especificidade de ligação com integrinas (RAHMAN et al., 1998; WIERZBICKA-PATYNOWSKI et al., 1999; BAZAN-SOCHA et al., 2004).

A porção C-terminal das desintegrinas também é importante nas interações dessas proteínas com as integrinas (WIERZBICKA-PATYNOWSKI et al., 1999). Diferenças espaciais entre o motivo no “loop” e o C-terminal da desintegrina podem determinar diferenças na ligação com integrinas (CHUANG et al., 2003). Tanto o “loop” como o C-terminal exibem um alto grau de mobilidade (ADLER et al., 1991; SAUDEK et al., 1991; SENN & KLAUS, 1993; SMITH et al., 1996; MONLEON et al., 2003; MONLEON et al., 2005)

Desta forma, a composição, a conformação e a dinâmica do “loop” com a porção C-terminal das desintegrinas determinam a interação seletiva com as integrinas. Tais fatores estruturais podem explicar o fato de diferentes desintegrinas contendo um mesmo motivo de ligação apresentarem afinidade e seletividade de

ligação diferentes para a mesma integrina. Diferentes desintegrinas com o motivo RGD interagem de maneiras distintas com integrinas que reconhecem a sequência RGD (α IIb β 3, α V β 3 e α 5 β 1) (DANEN et al., 1998; WIERZBICKA-PATYNOWSKI et al., 1999).

As desintegrinas podem ser divididas em cinco grupos diferentes baseando-se em seu tamanho e no número de pontes dissulfeto (CALVETE et al., 2003). O primeiro grupo inclui desintegrinas pequenas, formadas por 41-51 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto, e inclui a echistatina, a eristocophina, a eristostatina e a ocellatusina (CALVETE et al., 1992; BAUER et al., 1993; MCLANE et al., 1996; SMITH et al., 2002). Desintegrinas de tamanho médio, com cerca de 70 aminoácidos e seis pontes dissulfeto compõem o segundo grupo. A grande maioria das desintegrinas caracterizadas atualmente pertence a este grupo, que inclui a trigramina, a kistrina, a flavoridina, a albolabrina e a barbourina (ADLER et al., 1991; CALVETE et al., 1991; CALVETE et al., 1992; BAUER et al., 1993; KLAUS et al., 1993). O terceiro grupo inclui as desintegrinas de maior tamanho, como a bitistatina, composta de 84 resíduos e sete pontes dissulfeto (CALVETE et al., 1997) e a salmosina (PARK et al., 1998). Um quarto grupo é formado pelas desintegrinas-*like*, formadas por cerca de 100 resíduos e oito pontes dissulfeto no domínio desintegrina-*like*, e 110-120 resíduos no domínio rico em cisteínas com seis pontes dissulfeto (CALVETE et al., 2000). Pertencem a este grupo a jararagina-C, a catrocolastatina-C e a alternagina-C, entre outras (USAMI et al., 1994; SHIMOKAWA et al., 1997; SOUZA et al., 2000). Finalmente, o quinto grupo é formado por desintegrinas diméricas, diferentemente das proteínas dos grupos anteriores, monoméricas. As desintegrinas pertencentes ao quinto grupo podem ser homo ou heterodiméricas, e incluem, entre outras, a contortrostatina, EC3, EC6 e EMF10

(TRIKHA et al., 1994; MARCINKIEWICZ et al., 1999; MARCINKIEWICZ et al., 1999; MARCINKIEWICZ et al., 2000), que apresentam aproximadamente 67 resíduos cada cadeia, com dez cisteínas envolvidas na formação de quatro pontes dissulfeto intracadeia e duas intercadeias (CALVETE et al., 2000).

1.4.2.1. Efeitos de desintegrinas

Desde a sua descoberta em 1983 (OUYANG et al., 1983), as desintegrinas têm sido bastante estudadas, gerando informações importantes sobre sua estrutura e efeitos biológicos nas interações com integrinas.

O papel das desintegrinas na agregação plaquetária foi a primeira atividade a ser estudada já que essas proteínas foram primeiramente isoladas a partir de venenos hemorrágicos (HUANG et al., 1987). Diversos estudos mostraram, tanto *in vitro* como *in vivo*, que a ligação de desintegrinas-RGD à integrina plaquetária $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ bloqueia sua interação com o fibrinogênio, impedindo a última fase da agregação e a formação de coágulos, o que contribui para os sintomas hemorrágicos do envenenamento.

Desintegrinas-RGD monoméricas como a trigramina, a albolabrina, a kistrina, a flavoridina, a echistatina e a saxatilina são potentes inibidoras da agregação plaquetária (GOULD et al., 1990; HONG et al., 2002), efeito observado também para a contortostatina (CN), uma desintegrina homodimérica-RGD (CLARK et al., 1994). Desintegrinas-*like* também são capazes de inibir a agregação plaquetária, entretanto, o efeito se dá através da inibição da integrina $\alpha\text{2}\beta\text{1}$, principal receptor para o colágeno. Catrocollastatina-C, halysatina e jararagina-C são exemplos de proteínas que inibem a agregação plaquetária induzida por colágeno (SHIMOKAWA et al., 1997; LIU et al., 2000).

Além de estudar os efeitos das desintegrinas na agregação plaquetária, outros experimentos enfocando osteoporose (OURSLER & SPELSBERG, 1993), angiogênese (HUANG et al., 2001), metástase em camundongos (HUANG et al., 2001), entre outros, têm sido testados para avaliar os efeitos dessas proteínas em integrinas de diferentes células/tecidos.

1.4.2.2. Desintegrinas e câncer

Uma das áreas de investigação mais desafiadoras é o câncer. As células tumorais são caracterizadas por modificações na expressão de integrinas. Células metastáticas A375 de melanoma humano, por exemplo, têm a expressão da integrina $\alpha V\beta 3$ aumentada de 50-100 vezes (GEHLESEN et al., 1992). Por interagirem de forma específica com as integrinas, os efeitos das desintegrinas em células tumorais têm sido bastante estudados.

Diversas desintegrinas têm mostrado capacidade de interação com integrinas expressas em células tumorais. Os efeitos de ligação entre desintegrinas e integrinas têm sido verificados para desintegrinas RGD monoméricas, como a salmosina (KIM et al., 2004), triflavina (SHEU et al., 1994), DisBa-01 (RAMOS et al., 2008), entre outras; para a homodimérica contortostatina (ZHOU et al., 2000); e também para desintegrinas-*like*, como jararagina-C (MOURA-DA-SILVA et al., 2001) e alternagina-C (SOUZA et al., 2000). Salmosina (KANG et al., 2000) e DisBa-01 (RAMOS et al., 2008), por exemplo, reduziram de modo significativo o número de metástases experimentais *in vivo* da linhagem B16F10 de melanoma em camundongos, um dos modelos mais utilizados para estudo metastático nesses animais (RUCINSKI et al., 1990; SHEU et al., 1992; TRIKHA et al., 1994; BEVIGLIA

et al., 1995; MORRIS et al., 1995; STAIANO et al., 1995; KANG et al., 2000; ZHOU et al., 2000).

Em outro modelo *in vivo*, um vetor de expressão contendo o gene da salmosina foi administrado através de lipossomas em camundongos com tumores metastáticos B16F10 e resultou na diminuição do tumor e no número de metástases (KIM et al., 2004). A técnica utilizando lipossomas também foi utilizada com a desintegrina dimérica contortrostatina, resultando na diminuição do crescimento de tumor de mama *in vivo* em camundongos (SWENSON et al., 2004).

1.4.2.3. Desintegrinas e angiogênese

Interações adesivas e sinalização celulares mediadas por integrinas são essenciais para a angiogênese (BIKFALVI & BICKNELL, 2002), destacando-se as integrinas $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 2\beta 1$ (ECCLES, 2004). Assim, os efeitos das desintegrinas em eventos relacionados a angiogênese também têm sido estudados devido a importância da neovascularização em diversas patologias.

As desintegrinas têm se mostrado capazes de modular os eventos adesivos e sinalizações relacionadas à angiogênese.

As desintegrinas-RGD rhodostomina (YEH et al., 2001) e DisBa-01 (RAMOS et al., 2008), entre outras, inibem a proliferação de células endoteliais *in vitro* e *in vivo*. Além disto, ambas as desintegrinas, assim como outras, foram capazes de inibir a formação dos vasos propriamente dita através da interação com integrinas do endotélio. Tais resultados são interessantes do ponto de vista da busca de moléculas terapêuticas para o tratamento de doenças onde se deseja a inibição da neovascularização, como o câncer. A angiogênese associada a tumores também

pode ser inibida por desintegrinas, conforme já mostrado em diversos casos (YEH et al., 1998; KANG et al., 1999; ZHOU et al., 1999).

A desintegrina-*like* alternagina-C é capaz de modular a angiogênese *in vivo* (RAMOS et al., 2007). Entretanto, enquanto algumas concentrações testadas inibem a migração de células endoteliais e a formação de vasos (1.000nM), quantidades inferiores (10-100nM) curiosamente estimulam os processos (RAMOS et al., 2007). Assim, esta proteína se torna particularmente interessante dependendo do enfoque terapêutico, pró ou anti-angiogênico.

Embora um grande enfoque seja dado aos efeitos das desintegrinas na agregação plaquetária e no desenvolvimento tumoral, outras possíveis aplicações têm sido estudadas para essas proteínas, incluindo sua utilização para tratamento de doenças auto-imunes, inflamação, osteoporose, Alzheimer, asma e bloqueio de infecção viral (MARCINKIEWICZ, 2005) nos casos em que os vírus utilizam integrinas para entrar nas células, como o HIV e o hantavírus (LAFRENIE et al., 2002; MAHER et al., 2005).

1.4.2.4. Desintegrinas e sinalização celular

As integrinas, como já citado anteriormente, são importantes mediadores de sinalização celular que resultam em processos como migração, diferenciação e sobrevivência. Portanto, sabendo-se que as desintegrinas são capazes de interagir com as integrinas, essas proteínas do veneno de serpente têm sido estudadas quanto a sua capacidade de promoverem ou inibirem as cascatas de sinalização, o que pode ser bastante útil para uma melhor compreensão dos complexos processos celulares.

Jarastatina, uma desintegrina-RGD, foi capaz de disparar sinalização participante de quimitaxia em neutrófilos através da ligação com a integrina αM (COELHO et al., 1999). Efeitos similares foram observados para a alternagina-C (MARIANO-OLIVEIRA et al., 2003). Alternagina-C também foi capaz de disparar sinalizações envolvidas na sobrevivência celular de fibroblastos e células endoteliais (COMINETTI et al., 2004).

Os efeitos de desintegrinas na sinalização de células tumorais também vêm sendo avaliado. Contortrostatina aumentou a fosforilação nestas células através da integrina $\alpha V\beta 3$ (RITTER & MARKLAND, 2000), enquanto echistatina e flavoridina não tiveram o mesmo efeito (RITTER & MARKLAND, 2001).

1.4.2.5. Medicamentos derivados de venenos de serpentes

Os avanços científico/tecnológicos alcançados nas últimas décadas têm permitido que as pesquisas de proteínas dos venenos de serpente forneçam informações importantes para a compreensão de processos fisiológicos e, junto com elas, o desenvolvimento de agentes terapêuticos.

Diversas drogas derivadas de proteínas do veneno de serpentes estão em avanço clínico. Alguns dos medicamentos são derivados de desintegrinas, como Aggrastat (Merck®), Integrilina (Eptifibatide®) e Ancrod (Knoll®), utilizados para o tratamento de trombose e outras doenças cardiovasculares, sendo derivados, respectivamente da echistatina, da barbuorina e da kistrina.

Certamente o aumento de informações que colaborem para a compreensão dos efeitos das desintegrinas contribuirá para o desenvolvimento de um número maior de medicamentos derivados de venenos de serpentes buscando o tratamento de diversas condições patológicas.

1.5. ALTERNAGINA-C E DisBa-01

Os objetos do estudo apresentados nesta tese são as desintegrinas alternagina- C (ALT-C) e DisBa-01 ambas da serpente brasileira *Bothrops alternatus*, popularmente conhecida como urutu-cruzeiro.

A alternagina-C (ALT-C), uma desintegrina-*like* nativa com 29kDa, foi isolada em nosso laboratório (SOUZA et al., 2000). Análises da estrutura primária da ALT-C confirmaram sua homologia com as proteínas tipo desintegrina, com o motivo conservado ECD (Figura 12). A partir da sequência obtida para ALT-C, um peptídeo sintético foi projetado, abrangendo o motivo ECD e contendo uma ponte dissulfeto.

ALT-C interage com células de eritroleucemia K562- $\alpha 2\beta 1$ através da integrina $\alpha 2\beta 1$ (SOUZA et al., 2000) e também com fibroblastos, células endoteliais HUVEC (célula endotelial de veia umbilical humana) (COMINETTI et al., 2004), células tumorais das linhagens ECV-304, HeLa e MDA-MB-231 (resultados não publicados) e mioblastos (MESQUITA-FERRARI et al., 2009).

ALT-C incubada em sua forma solúvel com fibroblastos humanos, é capaz de induzir a expressão de diversos genes relacionados à proliferação e à sinalização celular, dentre eles o VEGF (COMINETTI et al., 2004). A desintegrina-*like* também é capaz de promover a proliferação de HUVECs, efeito não observado para fibroblastos de camundongo (COMINETTI et al., 2004) e nem para células de linhagens tumorais como ECV-304, HeLa e MDA-MB-231 (resultados não publicados), indicando uma possível especificidade de ação proliferativa de ALT-C para células endoteliais. Além disso, concentrações de ALT-C entre 10-100nM estimularam a migração de células endoteliais *in vitro* e a angiogênese *in vivo*, enquanto concentrações mais elevadas (1000nM) inibiram a proliferação, a

plaquetas, inibindo a formação de trombos *in vivo* (KAUSKOT et al., 2008). DisBa-01 foi capaz, ainda, de inibir a proliferação de células endoteliais HMEC-1 (célula endotelial de microvasculatura de derme humana) e a neovascularização *in vivo*, bem como a metástase de melanoma também *in vivo*, através da interação com a integrina $\alpha V\beta 3$ (RAMOS et al., 2008).

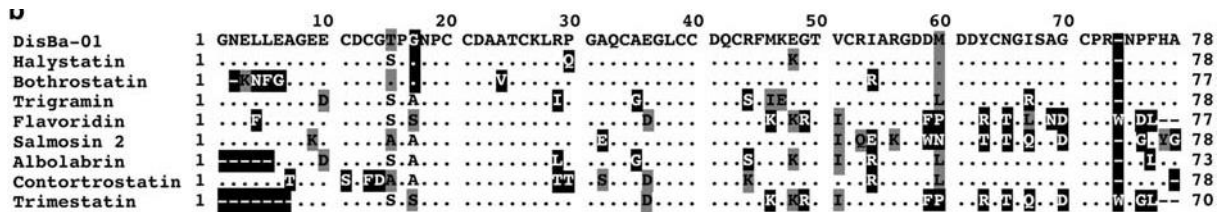


Figura 13 – Sequência de aminoácidos de DisBa-01. Através do seqüenciamento do cDNA de DisBa-01, sua sequência de aminoácidos foi deduzida e alinhada com as sequências de outras desintegrinas. Análises comparativas mostraram alta similaridade com outras desintegrinas. Os resíduos idênticos estão representados por pontos, resíduos conservados estão mostrados em fundo branco, destacados em cinza estão os resíduos similares mas não conservados e as substituições estão destacadas em preto. Extraída e modificada (RAMOS et al., 2008).

Diante dos resultados promissores obtidos com ALT-C e DisBa-01 em relação aos processos angiogênicos e metastáticos, resolveu-se investigar o papel das duas desintegrinas na expressão gênica de fatores de crescimento angiogênicos em células endoteliais e em fibroblastos, bem como na adesão de células tumorais a ECM, visando uma melhor compreensão dos mecanismos de ação de ambas as desintegrinas e suas possíveis aplicações terapêuticas.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos investigar os efeitos das desintegrinas ALT-C e DisBa-01 nos seguintes processos:

- a) adesão de células tumorais (MDA-MB-231 e B16F10) e não tumorais (fibroblastos) a componentes da matriz extracelular (ECM);
- b) adesão das células tumorais MDA-MB-231 ao colágeno e à matriz subendotelial produzida por HUVECs em condições dinâmicas (sob fluxo);
- c) expressão gênica do VEGF (isoforma 165) e dos seus receptores (VEGFR-1 e VEGFR-2) em culturas de células endoteliais (HUVEC e HMEC-1) e em fibroblastos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DAS DESINTEGRINAS

3.1.1. Alternagina –C (ALT-C)

ALT-C pura foi obtida conforme metodologia padronizada por SOUZA et al. (2000). Para tal, 50mg de veneno bruto da serpente *Bothrops alternatus* (cedido pelo Instituto Butantan de São Paulo, SP) foram solubilizados em 1,0ml de tampão Tris-HCl 10mM, NaCl 100mM, pH 8.6, e submetidos a cromatografia de gel-filtração em resina Superdex-200 (Amersham Biosciences), previamente equilibrada com o mesmo tampão. A eluição foi realizada com o mesmo tampão, sob fluxo de 0,5 ml/min. As frações foram coletadas com o auxílio de um coletor automático (Pharmacia) e foram incubadas durante 24 horas a 4 °C para a obtenção de ALT-C a partir do autoprocessamento da metaloprotease alternagina.

As frações contendo a proteína de interesse (primeiro pico da eluição) foram concentradas em Centricon Plus 20 (10,000 NMWL) (Millipore) e submetidas a uma segunda cromatografia de filtração na mesma coluna sob as mesmas condições da primeira etapa de purificação. Por último, as frações contendo ALT-C obtidas nesta segunda cromatografia foram submetidas a uma terceira etapa de purificação em cromatografia de troca aniônica. Para tal, as frações com ALT-C foram reunidas, dialisadas contra o tampão de equilíbrio Tris 10mM, pH 8. A amostra dialisada e concentrada foi aplicada em a uma coluna Mono Q Hr, previamente equilibrada com tampão Tris 10mM, pH 8 e eluída com gradiente de NaCl (0-1M), sob fluxo de 2 ml/min, no equipamento cromatográfico AKTA Explorer 10 (Amersham Bioscience).

As etapas da purificação foram acompanhadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) sob condições desnaturantes (LAEMMLI, 1970),

utilizando-se o sistema Mighty Small II (Hoefer). As amostras foram aplicadas em um gel de empilhamento de 5% de poliacrilamida e gel de resolução de 15% e submetidas à eletroforese com corrente elétrica de 15 mA e voltagem até 125V, durante aproximadamente uma hora e meia. As bandas protéicas foram reveladas incubando-se os géis em solução corante contendo 0,25% de *Comassie Brilliant Blue* R-250 (Sigma) dissolvidos em 50% isopropanol e 10% ácido acético, e solução descorante de 10% ácido acético e 10% de metanol.

O tampão de amostra consistiu de Tris-HCl 125mM, pH 6,8, SDS (dodecil sulfato de sódio) 4% (m/v), glicerol 20%, 0,02% de azul de bromofenol (m/w) e o agente redutor β -mercaptoetanol 0,1M. A amostra foi então submetida a 100 °C por 5 minutos.

A massa molecular aparente da proteína de interesse foi confirmada utilizando-se padrões de massa molecular produzidos em nosso laboratório a partir da mistura de proteínas puras (Sigma).

3.1.2. DisBa-01

DisBa-01 foi expressa e purificada de acordo com metodologia descrita abaixo (KAUSKOT et al., 2008; RAMOS et al., 2008).

3.1.2.1. Expressão

Culturas de *E. coli* BL21(DE3) pDisBa-01 (pET-28a com o cDNA da desintegrina) foram crescidas em meio LB seletivo com canamicina (30 μ g/ml) a 37 °C e 250rpm durante 16 horas. Após este período, o pré-inóculo foi diluído 25 vezes em LB contendo canamicina (30 μ g/ml) e a cultura foi incubada a 37 °C sob

agitação, até atingir a fase logarítmica de crescimento, identificada por uma $D.O_{.660nm} = 0.4 - 0.6$. Neste momento, foi retirada uma alíquota T0 para verificação da expressão protéica basal.

A cultura teve a expressão da *DisBa-01* induzida pela adição de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) em uma concentração final de 0,5mM, a 37 °C e 250rpm. Após duas horas de incubação, foi retirada uma nova alíquota (T2). O restante da cultura foi centrifugado, o precipitado foi ressuspendido em tampão de ligação Tris-HCl 20mM, NaCl 0,5M, Imidazol 5mM e as células foram lisadas através de sonicação. A cultura foi centrifugada e foi retirada uma alíquota do sobrenadante (S1). O precipitado foi ressuspendido em tampão de ligação com 6M de uréia e após incubação (1 hora no gelo), foi realizada nova sonicação. O lisado foi então novamente centrifugado. O sobrenadante (S2) foi armazenado a - 20 °C.

A expressão e solubilidade de *DisBa-01* foram analisadas em todas as alíquotas (T0, T2, S1, S2 e ppt) através eletroforese SDS-PAGE, nas mesmas condições descritas no item 3.1.1 para a purificação da ALT-C (Laemmli 1970).

3.1.2.2. Purificação

Após a confirmação da expressão da *DisBa-01* através de SDS-PAGE, a purificação da desintegrina foi realizada através de duas etapas cromatográficas. Na primeira, o sobrenadante S2 foi submetido a uma cromatografia de afinidade por quelação de metal em resina Ni-NTA (Sigma) sob condições desnaturantes (eluição com Imidazol 1M NaCl 0,5M, HCl 160mM pH7,9). As frações contendo *DisBa-01* foram reunidas, dialisadas (membrana Millipore) uma vez contra uréia 3M e três vezes contra água Milli-Q e concentradas sob vácuo (SC210A Speed Vac). Na segunda etapa de purificação, a amostra dialisada e concentrada foi aplicada em

uma coluna Mono Q Hr, previamente equilibrada com tampão Tris 10mM, pH 8 e eluída com gradiente de NaCl (0 – 1M), sob fluxo de 2 ml/min, no equipamento cromatográfico AKTA Explorer 10 (Amersham Bioscience).

As etapas de purificações foram analisadas por SDS-PAGE nas mesmas condições descritas no item 3.1.1 para a purificação da ALT-C (Laemmli 1970).

3.1.3. Peptídeo Sintético

Um peptídeo baseado na estrutura primária da ALT-C foi utilizado em alguns ensaios de expressão gênica.

a) C-R-A-S-M-S-E-C-D-P-A-E-H-NH₂ PM – 1406,59

O peptídeo foi cedido pela Profa. Dra. Maria Juliano, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

3.2. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A quantificação das desintegrinas foi realizada através do kit *BCA™ Protein Assay Kit* (Pierce), uma formulação baseada no método do ácido bicinonínico (BCA) para a detecção colorimétrica e quantificação de proteína total (SMITH et al., 1985). Uma série de diluições de soroalbumina bovina (BSA) de concentração conhecida (25µg/ml a 2.000µg/ml) foi preparada e testada juntamente com as amostras de concentração desconhecida, de acordo com as instruções do fabricante. A reação produzida por este método exibe uma forte absorvância em 562nm que é aproximadamente linear com as concentrações protéicas crescentes em um intervalo de 20 a 2.000µg/ml. Desta forma, após a leitura da absorvância de

todas as reações, a concentração protéica das duas desintegrinas foi determinada a partir da curva padrão construída através das diluições de BSA.

3.3. LINHAGENS CELULARES

Para a realização dos ensaios foram utilizadas as seguintes linhagens celulares:

- HUVEC (células endoteliais de veia umbilical humana), cultura primária
- HMEC-1 (células de endotélio microvascular humano), nas passagens 16 e 17
- Células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama, gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Michel Crépin (INSERM U553, França), passagens 20-35.
- Fibroblastos humanos FGH (fibroblastos gengivais humanos), adquiridos no BCRJ (Banco Banco de Células do Rio de Janeiro), passagens 15-30.
- Células de melanoma murino B16F10 gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Michel Crépin (INSERM U553, França), passagens 27-40.

3.3.1. Cultivo das células

As células endoteliais HUVEC foram isoladas através de digestão do interior da veia umbilical por colagenase 0,2% (JAFFE et al., 1973) e mantidas em meio 199 (M-199) com HEPES (Sigma), suplementado com penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 100 µg/ml, fungizona anfotericina-B 5 µg/ml, l-glutamina 2 mM e FBS 10% (Gibco) ou em meio MCDB 131 suplementado com l-glutamina 2 mM, penicilina

100 UI/ml, estreptomicina 100 µg/ml, hidrocortisona 1mg/ml, fator de crescimento epidérmico (EGF) (Gibco) 2µg/ml e soro fetal bovino (FBS) (Gibco) 10%.

As células da linhagem HMEC-1 foram cultivadas em meio MCDB-131 (Gibco) suplementado com FBS (Gibco) 10%, l-glutamina 2mM, hidrocortisona 1mg/ml, fator de crescimento epidérmico (EGF) (Gibco) 10µg/ml e antibióticos.

As células da linhagem MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama e os fibroblastos humanos foram cultivados em meio DMEM (Vitrocell) suplementado com FBS (Vitrocell) 10%, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 100 µg/ml, l-glutamina 2mM e fungizona anfotericina-B 5 µg/ml.

As células de melanoma murino B16F10 foram cultivadas em meio RPMI (Vitrocell) suplementado com FBS (Vitrocell) 10%, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 100 µg/ml, l-glutamina 2mM e fungizona anfotericina-B 5 µg/ml.

Todas as células foram mantidas a 37 °C, 5% CO₂ em estufa umidificada.

3.4. OBTENÇÃO DE ECM PRODUZIDA POR HUVEC

3.4.1. ECM para ensaios de inibição da adesão estática

Para obtenção da ECM para os ensaios de adesão estática, 5×10^4 células em meio MCDB 131 foram adicionadas aos poços recobertos por gelatina 0,5% de placas de 96 poços e cultivadas a 37 °C, 5% CO₂ em estufa umidificada. No dia seguinte, o meio foi trocado por meio suplementado com 10% de FBS. Dois a três dias após atingirem confluência, as células foram lisadas imediatamente antes de seu uso com NH₄OH 100nmol/L em PBS 100mmol/L pH 7,4 contendo NEM 5mmol/L e PMSF 1 mmol/L (COELHO et al., 2004; GOMES et al., 2004) e a ECM isolada foi lavada três vezes com PBS.

3.4.2. Obtenção de ECM produzida por HUVECs para ensaios de inibição da adesão sob fluxo

As células em meio 199 com 10% de FBS foram adicionadas a lamínulas de vidro recobertas com gelatina 0,5% e cultivadas 37 °C, 5% CO₂ em estufa umidificada. Dois a três dias após atingirem confluência, as células foram lisadas imediatamente antes do início do experimento com NH₄OH 100nmol/L em PBS 100mmol/L pH 7,4 contendo NEM 5mmol/L e PMSF 1 mmol/L (COELHO et al., 2004; GOMES et al., 2004) e a ECM isolada foi lavada três vezes com PBS.

3.5. ENSAIOS DE PROMOÇÃO DE ADESÃO CELULAR

Os efeitos da ALT-C e DisBa-01 foram estudados na adesão de fibroblastos humanos (linhagem FGH), células tumorais de mama MDA-MB-231 e melanoma murino B16F10.

Para os ensaios de promoção da adesão celular de células tumorais de mama MDA-MB-231, poços de placas de 96 poços foram sensibilizados com ALT-C e DisBa-01 em diversas concentrações (0,1; 1; e 10 µg/poço). Foi testada também a capacidade adesiva de diversos componentes da ECM e da membrana basal: colágeno tipos I, III e IV, laminina-1, fibronectina e trombospondina-1 sendo cada componente imobilizado em placas de 96 poços na concentração de 1 µg/poço, “overnight” a 4 °C. A adesão foi verificada, ainda, para matrigel (BD Matrigel™ Matrix), preparado de acordo com instruções do fabricante (170 µl/poço). Soroalbumina bovina (BSA) 2% foi adicionada aos poços do controle negativo, enquanto a adesão ao colágeno tipo I foi considerada como sendo 100%.

Os poços foram bloqueados com PBS contendo BSA 0,5% (30 minutos, temperatura ambiente), sendo então lavadas com DMEM sem FBS. 5 x 10⁴ células

foram adicionadas em cada poço. Decorridos 45 minutos (a 37 °C), os poços foram lavados duas vezes com DMEM sem FBS e as células aderidas foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% ou etanol 70% (100µl), por 10 minutos. Após lavagem dos poços com PBS (100µl), as células aderidas foram coradas com 70µl Cristal Violeta 0,5% durante 30 minutos. Em seguida, os poços foram lavados com PBS diversas vezes para retirada do excesso de corante e as células coradas foram solubilizadas em 100µl SDS 1% durante 30 minutos. A leitura da placa foi feita a 540nm em leitor da absorbância Dynex.

Os experimentos foram realizados no mínimo três vezes, em triplicata. Os dados foram comparados estatisticamente utilizando-se análise de variância ANOVA e o teste de Dunnett. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ foram utilizados como critério de significância. Os resultados foram expressos na forma de porcentagens em relação a adesão ao colágeno tipo I.

Ensaio de adesão com os fibroblastos humanos e com as células de melanoma murino B16F10 foram realizados seguindo-se o mesmo protocolo descrito para as MDA-MB-231. A adesão dos fibroblastos foi verificada para os colágeno tipos I, III e IV, e para a fibronectina (1 µg/poço), bem como para as desintegrinas, enquanto B16F10 foram testadas também sobre a vitronectina além dos substratos utilizados para os fibroblastos.

3.6. ENSAIOS DE INIBIÇÃO DE ADESÃO CELULAR

ALT-C e DisBa-01 foram testadas na adesão dos fibroblastos ao colágeno tipo I, das células MDA-MB-231 aos mesmos componentes utilizados nos ensaios de promoção de adesão e também sobre a ECM produzida por HUVECs (obtenção descrita em 3.4.1), e na adesão das células B16F10 aos colágenos I e III.

As proteínas de matriz foram imobilizadas em placas de 96 poços na concentração de 1 µg/poço, “overnight” a 4 °C. BSA 2% foi adicionada aos poços do controle negativo. As placas foram então incubadas a 4°C *overnight*.

Os poços foram bloqueados com PBS contendo BSA 0,5% (30 minutos, temperatura ambiente), sendo então lavados com DMEM sem FBS. 5×10^4 células foram incubadas com ALT-C ou DisBa-01 (concentração final de 1 a 10.000 nM para fibroblastos e células MDA-MB-231; 1 a 2.500nM para células B16F10) durante 30 minutos, a 37 °C e adicionadas em cada poço. A adesão das células foi verificada da mesma maneira descrita para os ensaios de promoção da adesão acima.

Os experimentos foram realizados no mínimo três vezes, em triplicata. Os dados foram comparados estatisticamente utilizando-se análise de variância ANOVA e o teste de Dunnett. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ foram utilizados como critério de significância. Os resultados foram expressos na forma de porcentagens em relação ao controle positivo (células não incubadas com as desintegrinas).

3.7. ENSAIOS DE DESADESÃO/DESCOLAMENTO CELULAR

Os efeitos de ALT-C e DisBa-01 foram verificados também na adesão dos fibroblastos e das células tumorais de mama e de melanoma murino previamente aderidas ao colágeno tipo I, sendo as desintegrinas também testadas em células B16F10 aderidas ao colágeno III. Para tal, o colágeno foi imobilizado em placas de 96 poços na concentração de 1 µg/poço, incubadas a 4°C *overnight*. BSA 2% foi adicionada aos poços do controle negativo.

Os poços foram bloqueados com PBS contendo BSA 0,5% (30 minutos, temperatura ambiente), sendo então lavados com DMEM sem FBS. 5×10^4 células

em DMEM sem FBS foram adicionadas em cada poço e após 2 horas de incubação em estufa, ALT-C ou DisBa-01 (1 a 10.000 nM, concentração final) foram adicionadas aos poços, incubando-se novamente a placa durante 30 minutos. A adesão das células foi verificada da mesma maneira descrita para os ensaios de promoção e inibição da adesão descritos acima.

Os experimentos foram realizados no mínimo três vezes, em triplicata. Os dados foram comparados estatisticamente utilizando-se análise de variância ANOVA e o teste de Dunnett. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ foram utilizados como critério de significância. Os resultados foram expressos na forma de porcentagens em relação ao controle positivo (células não incubadas com as desintegrinas).

3.8. ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO/VIABILIDADE CELULAR

Os efeitos da ALT-C e DisBa-01 foram estudados na proliferação dos fibroblastos humanos e das células tumorais de mama MDA-MB-231.

Colágeno tipo I foi imobilizado em placas de 96 poços na concentração de 1 $\mu\text{g/poço}$, “overnight” a 4 °C. As placas foram então incubadas a 4 °C *overnight*.

Os poços foram bloqueados com PBS contendo BSA 0,5% (30 minutos, temperatura ambiente), sendo então lavados com DMEM sem FBS. 5×10^3 células em meio DMEM com soro foram adicionadas em cada poço e após 2 horas de incubação em estufa, ALT-C ou DisBa-01 (1 a 10.000 nM, concentração final) foram adicionadas aos poços, incubando-se novamente a placa durante 24, 48 ou 72 horas. A proliferação celular foi verificada da mesma maneira descrita para os ensaios de adesão. BSA 2% foi adicionada aos poços do controle negativo. A proliferação de células incubadas apenas com PBS foi considerada como 100%.

Os experimentos foram realizados no mínimo três vezes, em triplicata. Os dados foram comparados estatisticamente utilizando-se análise de variância ANOVA e o teste de Dunnett. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ foram utilizados como critério de significância. Os resultados foram expressos na forma de porcentagens em relação ao controle positivo (células não incubadas com as desintegrinas).

3.9. ENSAIOS DE INIBIÇÃO DE ADESÃO CELULAR SOB FLUXO

Os ensaios de adesão celular sob fluxo foram realizados de acordo com (COELHO et al., 2004; GOMES et al., 2004). Células MDA-MB-231 marcadas com “cell tracker red” CMTPX (Invitrogen) (20-30 minutos a 37 °C) foram adicionadas ao sangue total anticoagulado com heparina (13 IU/mL) na concentração final de 10^7 células/mL, imediatamente antes da realização do ensaio. Para verificar os efeitos de ALT-C e DisBa-01 na adesão celular sob fluxo, as desintegrinas foram incubadas em diversas concentrações (ALT-C 10, 100 e 1.000nM, DisBa 100 e 1.000nM) por 30 minutos com as células marcadas antes de sua adição ao sangue total. Como controle positivo, as células foram incubadas com PBS.

O sangue total com as células tumorais marcadas foi submetido a uma câmara de fluxo (50 s^{-1}) em contato com as lamínulas previamente recobertas por colágeno tipo I (2,5mg/mL) ou por ECM produzida por HUVECs (obtida conforme descrito em 5.11). Decorridos 10 minutos, a câmara foi lavada com PBS (50 s^{-1} , 5 min). A adesão de células tumorais foi visualizada com microscópio epifluorescente equipado com filtro de dois comprimentos de onda (Nikon Eclipse TE 300). Os dados dos experimentos foram obtidos através da contagem do número de células tumorais aderidas em 15 campos diferentes/tratamento capturados através de uma câmera fotográfica acoplada ao microscópio.

Os experimentos foram realizados no mínimo três vezes, em triplicata. Os dados foram comparados estatisticamente utilizando-se análise de variância ANOVA e o teste de Dunnett. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ foram utilizados como critério de significância. Os resultados foram expressos na forma de porcentagens em relação ao controle positivo (células não incubadas com as desintegrinas).

3.10. CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE INTEGRINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

A expressão de algumas integrinas na superfície dos fibroblastos humanos e das células tumorais MDA-MB-231 e B16F10 foi analisada através de citometria de fluxo. Para tal, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, lavadas com PBS e 1×10^6 células foram incubadas com 1 μg de anticorpo em gelo. Os anticorpos utilizados foram: anti- $\alpha 2$, anti- $\alpha 3$, anti- $\alpha 4$, anti- $\alpha 5$, anti- $\alpha 6$, anti- αV , anti- $\beta 1$, anti- $\beta 4$, anti- $\alpha V\beta 3$ e anti- $\alpha V\beta 5$ (Santa Cruz). Após 30 minutos, as células foram lavadas com 1ml de PBS, centrifugadas (1.200 rpm, 10 minutos) e incubadas com 0,5 μg de anti-IgG de camundongo marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Santa Cruz). Decorridos mais 30 minutos de incubação em gelo e na ausência de luz, as células foram novamente lavadas com PBS e analisadas em um citômetro de fluxo FACscalibur (BD Biosciences).

3.11. ENSAIOS DE EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

Para investigar modificações induzidas por ALT-C e DisBa-01 na expressão gênica do VEGF e seus receptores, VEGFR-1 e -2, em células endoteliais HUVEC e HMEC-1 e em fibroblastos humanos, as células foram tratadas com diferentes concentrações das desintegrinas por diferentes períodos de incubação. Também

foram estudados os efeitos de um peptídeo sintético (ALT-C PEP), baseado na seqüência adesiva da ALT-C, na expressão de HUVECs.

As células em meio adequado (aproximadamente 80% da confluência) foram adicionadas a placas de Petri de 6 cm de diâmetro (Corning) tratadas para cultura celular, previamente recobertas por gelatina 2% (HUVEC) ou colágeno tipo I (1mg/ml) e incubadas por aproximadamente 1 hora e meia em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após sua adesão, ALT-C ou DisBa-01 em diferentes concentrações (1nM, 10nM, 100nM, 1000nM) foram adicionadas em cada placa, as quais foram novamente incubadas em estufa durante 4h, 24h, 48h ou 72h. Apenas nos fibroblastos foram testados nas condições envolvendo 1.000nM das desintegrinas e cultivo até 72 horas. Células não tratadas com as desintegrinas foram utilizadas como controle. Após o término de cada período de incubação, o meio de cultura (meio condicionado) de cada placa foi aspirado.

Para análise da expressão gênica ao nível de RNA, as células foram lisadas e o RNA total foi isolado através do uso de TRIzol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA obtido foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro (A_{260nm}) e sua integridade foi verificada através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1%. A partir do RNA mensageiro foi produzido o cDNA, utilizando-se kit *M-MLV Transcriptase Reversa* (Promega), seguindo-se as instruções do fabricante.

Primers para o VEGF foram desenhados a partir da seqüência do VEGF NM_001033756, através do site www.idtdna.com. A quantificação relativa da expressão dos genes em estudo foi normalizada através da comparação da amplificação de controles endógenos, utilizando-se para tal os genes da β -actina e da GAPDH.

Os *primers* para o receptor VEGFR-1 foram sintetizados baseando-se nas seqüências fornecidas por Hervé *et al.* (2005), enquanto os *primers* para o vEGFR-2 foram desenhados a partir da seqüência AF063658.

Seqüência de *primers* utilizados nos experimentos de PCR em tempo real

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	Produto amplificado (pb)
VEGF	CACATTGTTGGAAGAAGCAGCCCA	ACTCACACACACACAACCAGGTCT	165
VEGFR-1	CGACGTGTGGTCTTACGGAGTA	CTTCCCTCAGGCGACTGC	107
VEGFR-2	TCTCAATGTGGTCAACCTTCTAGG	AAATTTGCAGAATTCCACAATCACC	79
β -actina	CGTGGGCCGCCCTAGGCACCAGGG	CGGAGGAAGAGGATGCGGCAGTGG	604
GAPDH	GATGCTGGTGCTGAGTATGT	GTGGTGCAGGATGCATTGCT	197

A reação de PCR em tempo real foi padronizada para os *primers* utilizando-se o kit *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), o qual é baseado na detecção do agente SYBR® Green. Cada reação consistiu de 0,5 μ l de cDNA molde; 1,25 μ l de cada *primer* 10 μ M (0,5 μ M final); 12,5 μ l do QuantiMix EASY Mastermix (contendo *Real Time Polymerase*, *sNTPs*, *MgCl₂*, *Quantisyg Buffer* e *SYBR® Green*) e água estéril bi-destilada para um total de 25 μ l. O ciclo da amplificação foi padronizado para cada par de *primer*, de acordo com a temperatura de *melting* de cada um. As amplificações ocorreram conforme as condições a seguir:

VEGF	
95 °C, 10 minutos	
Ciclos (40 repetições)	Etapa 1: 95 °C, 15 segundos
	Etapa 2: 60 °C, 15 segundos
	Etapa 3: 72 °C, 20 segundos
<i>Melt</i> (72-95 °C), 45 segundos na etapa 1, 5 segundos nas etapas seguintes	

VEGFR-1 e VEGFR-2	
95 °C, 10 minutos	
Ciclos (40 repetições)	Etapa 1: 95 °C, 15 segundos
	Etapa 2: 55 °C, 5 segundos
	Etapa 3: 72 °C, 20 segundos
<i>Melt</i> (72-95 °C), 45 segundos na etapa 1, 5 segundos nas etapas seguintes	

β-actina	
95 °C, 10 minutos	
Ciclos (40 repetições)	Etapa 1: 95 °C, 15 segundos
	Etapa 2: 60 °C, 15 segundos
	Etapa 3: 72 °C, 20 segundos
<i>Melt</i> (72-95 °C), 45 segundos na etapa 1, 5 segundos nas etapas seguintes	

GAPDH	
95 °C, 10 minutos	
Ciclos (40 repetições)	Etapa 1: 95 °C, 15 segundos
	Etapa 2: 56 °C, 15 segundos
	Etapa 3: 72 °C, 20 segundos
<i>Melt</i> (72-95 °C), 45 segundos na etapa 1, 5 segundos nas etapas seguintes	

O tamanho dos fragmentos amplificados foi confirmado através de eletroforese em gel de agarose 1%.

O nível comparativo de expressão para os genes em cada condição é dado pela *unidade arbitrária*, calculada como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (método do $\Delta\Delta Ct$), onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{tratado}} - \Delta Ct_{\text{controle}}$ (Ct , *threshold cycle*). Os valores de Ct das amostras tratadas e dos controles foram normalizados para a quantidade de β -actina ($\Delta Ct_{\text{controle ou tratado}} = Ct_{\text{controle ou tratado}} - Ct_{\beta\text{-actina controle ou tratado}}$).

Para a documentação de imagens dos géis de poliacrilamida, agarose-formaldeído e agarose foi utilizado o sistema de documentação de imagens Kodak.

Os experimentos foram realizados independentemente, em duplicata. Os dados foram comparados estatisticamente utilizando-se análise de variância ANOVA e o teste de Dunnett. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ foram utilizados como critério de significância. Os resultados foram expressos na forma de porcentagens em relação ao controle positivo (células não incubadas com as desintegrinas).

Parte dos ensaios cujos resultados são apresentados nesta tese foi realizado através de colaborações com outras instituições de ensino e pesquisa.

O efeito das desintegrinas na expressão do VEGF e seus receptores VEGFR-1 e -2 em células endoteliais HUVEC e HMEC-1 foram iniciados nos laboratórios do Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), sob orientação da Prof^a Verônica Maria Morandi da Silva (cultivo e lise celular), e finalizados em nosso laboratório (extração de RNA e ensaios de PCR em tempo real), ou em colaboração com a UERJ através do envio das células para realização total em São Carlos.

Os ensaios de adesão estática com a linhagem MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama foram realizados sob a supervisão Prof. Dr. Michel Crépin e da Profa. Dra. Françoise Fauvel-Lafève, durante estágio na Unidade 553 do INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), no “Hôpital Saint Louis”, Paris, França (colaboração internacional FAPESP-INSERM).

A adesão das células MDA-MB-231 sob fluxo foi verificada através de ensaios realizados primeiramente na Unidade 553 do INSERM, sob a supervisão Profa. Dra. Françoise Fauvel-Lafève, e posteriormente repetidos nos laboratórios do Departamento de Biologia Celular e Genética da UERJ, sob orientação das Prof^{as} Verônica Maria Morandi da Silva e Camila Castro Figueiredo.

4. RESULTADOS

Para a purificação de ALT-C, o veneno bruto de *B. alternatus* foi fracionado através de três etapas cromatográficas, sendo as duas primeiras em resina de gel-filtração e terceira em coluna de troca iônica (SOUZA et al., 2000). A análise em SDS-PAGE de frações obtidas após a última etapa cromatográfica mostra a obtenção de ALT-C purificada (figura 14).

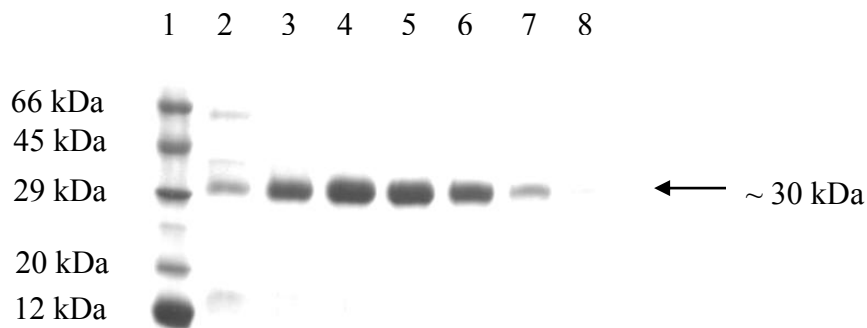


Figura 14 – Análise do perfil eletroforético das frações obtidas na segunda etapa de purificação da ALT-C. SDS-PAGE 15%. 1) Padrão de massa molecular; 2 – 8) frações eluídas.

DisBa-01 pura foi obtida de acordo com a metodologia descrita por Ramos et al. (2008). Resumidamente, a desintegrina recombinante foi expressa em células bacterianas BL21(DE3) utilizando-se pET-28a (figura 15a). A purificação de DisBa-01 foi realizada através de cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA e cromatografia de troca iônica (RAMOS et al., 2008). A análise em SDS-PAGE de frações obtidas após a cromatografia de troca iônica mostra que DisBa-01 pura foi obtida (figura 15b).

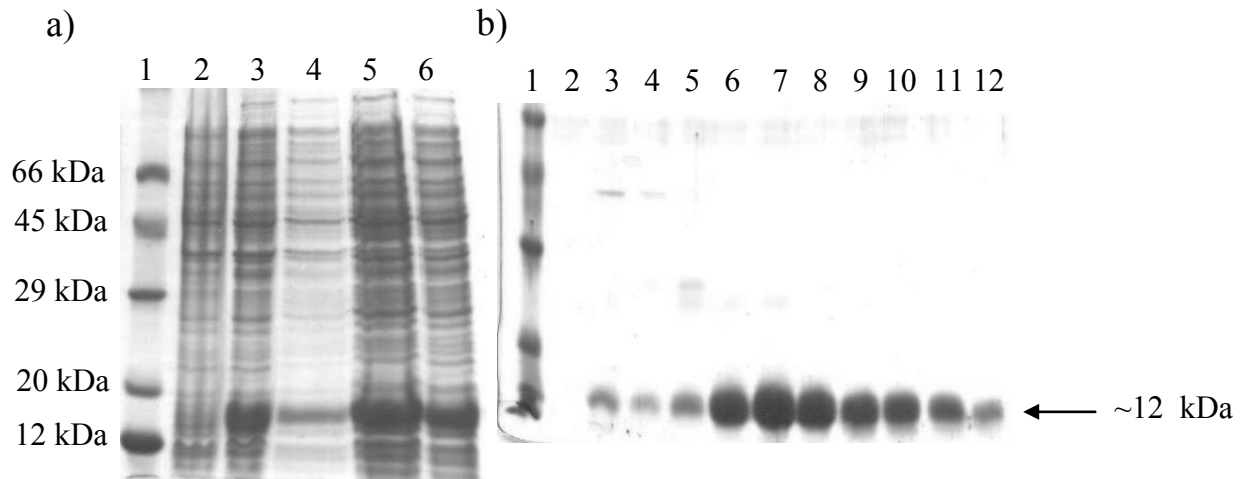


Figura 15 – Expressão (a) e purificação (b) de DisBa-01. SDS-PAGE 15%. (a) 1) Padrão de massa molecular; 2) T0; 3) T3; 4) S1; 5) S2. (b) 1) Padrão de massa molecular; 1) Padrão de massa molecular; 2-12) Frações eluídas.

4.1. ENSAIOS DE ADESÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para estudar os efeitos de ALT-C e DisBa-01 na adesão de células da linhagem MDA-MB-231 (tumor de mama), fibroblastos humanos e na linhagem B16F10 (melanoma murino) foram realizados ensaios de promoção de adesão, inibição da adesão e desadesão ou descolamento celular.

As desintegrinas foram testadas, ainda, na proliferação das células tumorais de mama e nos fibroblastos.

4.1.1. Células de adenocarcinoma mamário MDA-MB-231

4.1.1.1. Promoção de adesão celular

Primeiramente, foram realizados ensaios de promoção da adesão para verificar se as desintegrinas são capazes de agir como moléculas de adesão para essas células tumorais mamárias. Assim, ALT-C e DisBa-01 em diferentes concentrações foram imobilizadas nos poços e sua capacidade de adesão foi

comparada a adesão mediada por diversos componentes da ECM e da membrana basal: colágeno tipos I, III e IV, laminina-1 (LN), fibronectina (FN) e trombospondina-1 (TSP), e também sobre matrigel (M).

ALT-C não foi capaz de promover a adesão das células tumorais de mama, enquanto as células aderiram a DisBa-01 em todas as quantidades testadas, ambas comparadas ao BSA 2%, controle negativo (Figura 16). DisBa-01 1 e 10 ug/poço apresentaram uma alta capacidade de promoção da adesão das células MDA-MB-231, comparável estatisticamente a dos colágenos I e III, fibronectina e matrigel, substratos aos quais essas células aderiram mais fortemente. Das proteínas de ECM testadas, apenas a laminina e a trombospondina não promoveram a adesão das células de carcinoma mamário (Figura 16).

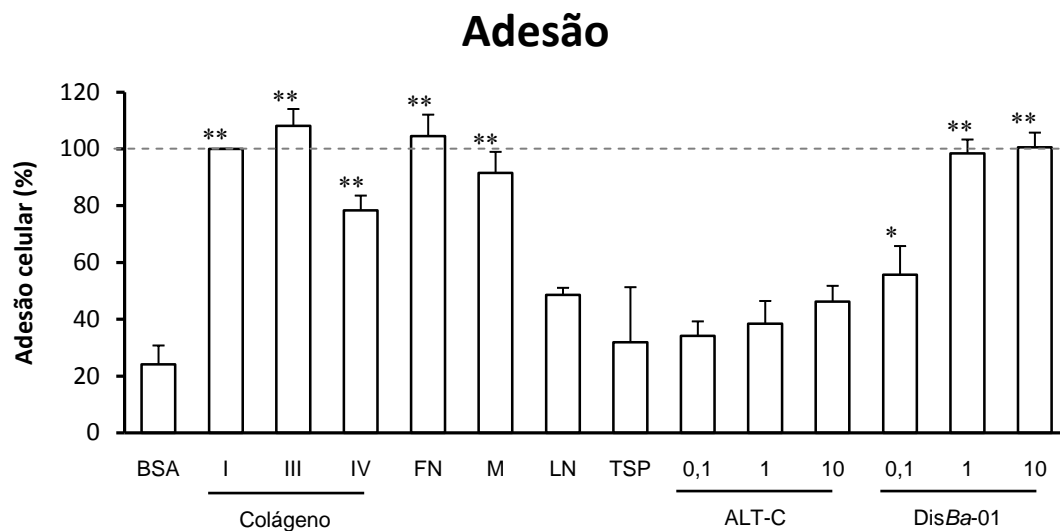


Figura 16 – Efeito de ALT-C e DisBa-01 na adesão de células MDA-MB-231. As células foram adicionadas sobre ALT-C ou DisBa-01 imobilizadas em diversas concentrações. A adesão das células sobre diversas proteínas da ECM e sobre matrigel. FN: fibronectina, M: matrigel, LN: laminina, TSP: trombospondina. Valores de p determinados pelo teste de Dunnett, comparando-se ao controle negativo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.1.1.2. Inibição de adesão celular

Após verificar os efeitos de ALT-C e DisBa-01 imobilizadas na interação com as células da linhagem MDA-MB-231, foram realizados os ensaios de inibição de adesão.

ALT-C inibiu a adesão de células MDA-MB-231 ao colágeno tipo I, conforme já havia sido constatado anteriormente (TERRUGGI, 2006), ao contrário da DisBa-01, que não apresentou efeitos inibitórios na adesão dessas células ao colágeno I (Figura 17a). ALT-C 1.000nM inibiu aproximadamente 35% da adesão de MDA-MB-231, enquanto tanto em 5.000nM como 10.000nM inibiram 67% da celular.

Similarmente ao observado com o colágeno I, ALT-C também inibiu a adesão celular ao colágeno III (Figura 17b). O efeito se deu nas mesmas concentrações observadas para o colágeno I, porém com menores taxas de inibição, aproximadamente 26% de inibição na incubação com ALT-C 1.000nM, 48% com ALT-C 5.000nM e 53% com ALT-C em 10.000nM. DisBa-01, por sua vez, aumentou a adesão celular em 17% em sua maior concentração testada, 10.000nM. (Figura 17b).

A adesão das células MDA-MB-231 ao colágeno tipo IV também foi inibida por ALT-C, porém o efeito foi verificado sob concentração maior do que observado para os colágenos I e III, a partir de 5.000nM e não de 1.000nM (Figura 17c). ALT-C 5.000nM e 10.000nM inibiram aproximadamente 46% e 58% da adesão celular ao colágeno IV, respectivamente. Assim como verificado para o colágeno tipo I, DisBa-01 não foi capaz de inibir a adesão ao tipo IV (Figura 17c).

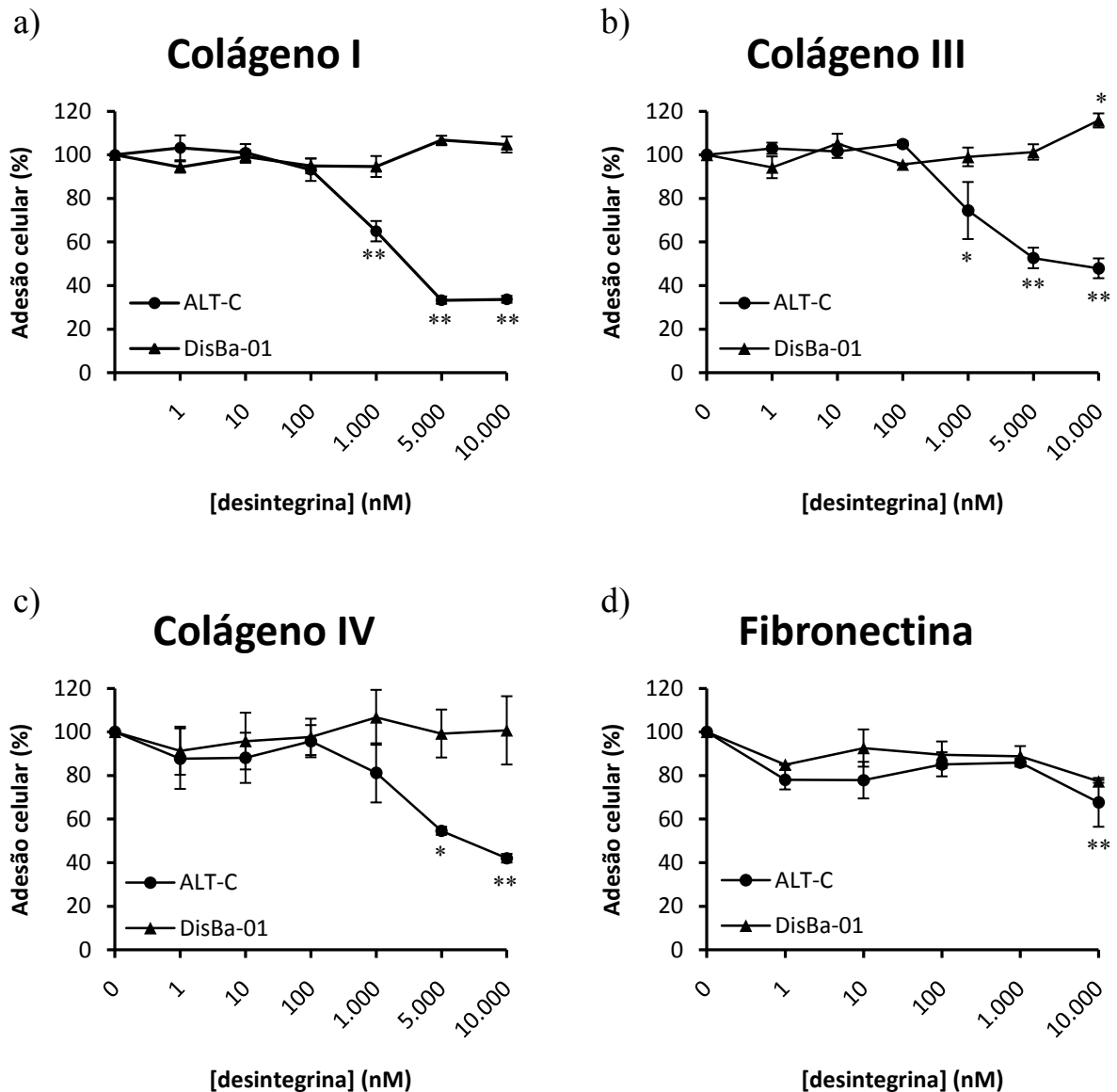


Figura 17 – Efeito de ALT-C e DisBa-01 na inibição da adesão de células MDA-MB-231 aos colágenos tipo I (a), III (b) e IV (c), e à fibronectina (d). Células incubadas com diversas concentrações de ALT-C ou DisBa-01 foram adicionadas sobre diferentes tipos de colágeno ou fibronectina. Valores de p determinados pelo teste de Dunnett, comparando-se ao controle positivo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

ALT-C também foi capaz de inibir a adesão celular a fibronectina, o que ocorreu apenas na maior concentração testada, 10.000nM, com inibição da adesão de aproximadamente 33% das células (Figura 17d).

ALT-C foi capaz de inibir a adesão celular a laminina em quase todas as concentrações testadas: ALT-C 10nM inibiu aproximadamente 27% da adesão; 100nM inibiu 29%; 1.000nM inibiu 25%; e 10.000nM inibiu 51% (Figura 18d).

DisBa-01 não apresentou efeitos na adesão das células a fibronectina (Figura 17d) e a laminina-1 (Figura 18a). Nenhuma das desintegrinas foi capaz de inibir a adesão a trombospondina (Figura 18b).

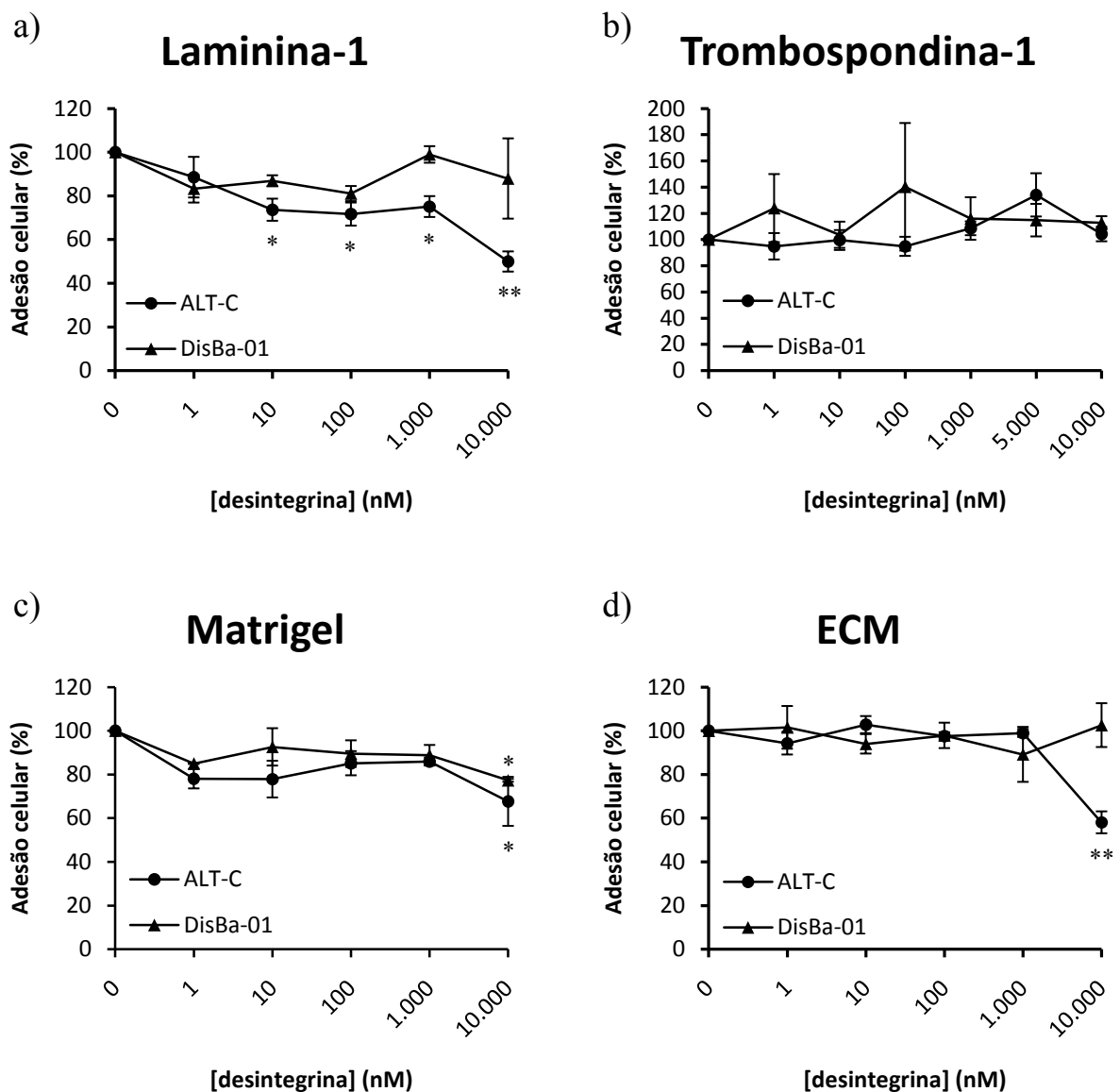


Figura 18 – Efeito de ALT-C e DisBa-01 na inibição da adesão de células MDA-MB-231 à laminina-1 (a), trombospondina-1 (b), matrigel (c) e ECM subendotelial (d). Células incubadas com diversas concentrações de ALT-C ou DisBa-01 foram adicionadas sobre diferentes componentes de ECM, matrigel ou ECM de HUVEC. Valores de p determinados pelo teste de Dunnett, comparando-se ao controle positivo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Nos ensaios utilizando o matrigel, houve inibição da adesão das células incubadas com 10.000nM de ambas as desintegrinas (Figura 18c), com as taxas de inibição da adesão sendo de 33% para ALT-C e 23% para DisBa-01.

A adesão das células MDA-MB-231 a ECM produzida por HUVECs foi inibida apenas por ALT-C 10.000nM (Figura 18d), com taxa de inibição de 42%.

4.1.1.3. Desadesão/descolamento celular

Os efeitos de ALT-C e DisBa-01 também foram verificados nas células tumorais de mama previamente aderidas ao colágeno tipo I. ALT-C 2.500nM foi capaz de desaderir 12% das células do colágeno I, enquanto DisBa-01 não apresentou efeito nas doses testadas (Figura 19).

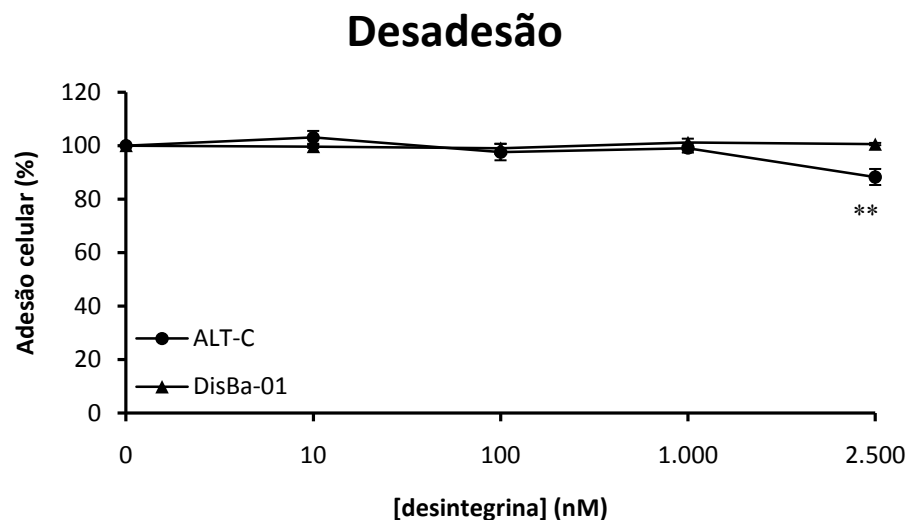


Figura 19 – Efeito de ALT-C e DisBa-01 em células MDA-MB-231 aderidas ao colágeno I. As células aderidas ao colágeno foram incubadas com diversas concentrações de ALT-C ou DisBa-01. Valores de p determinados pelo teste de Dunnett, comparando-se ao controle positivo. ** $p < 0,01$.

4.1.1.4. Proliferação/viabilidade celular

Além de verificar os efeitos de ALT-C e DisBa-01 na adesão celular, ambas as desintegrinas foram testadas quanto ao seu efeito na proliferação das células previamente aderidas ao colágeno I.

ALT-C foi capaz de diminuir a proliferação das células MDA-MB-231 incubadas com 2.500nM dessa desintegrina em 24 e 48 horas de incubação, com taxa de inibição de 29% e 18%, respectivamente (Figura 20a). DisBa-01, por sua vez, não apresentou efeitos sobre a proliferação de células desta linhagem nas concentrações utilizadas (Figura 20b).

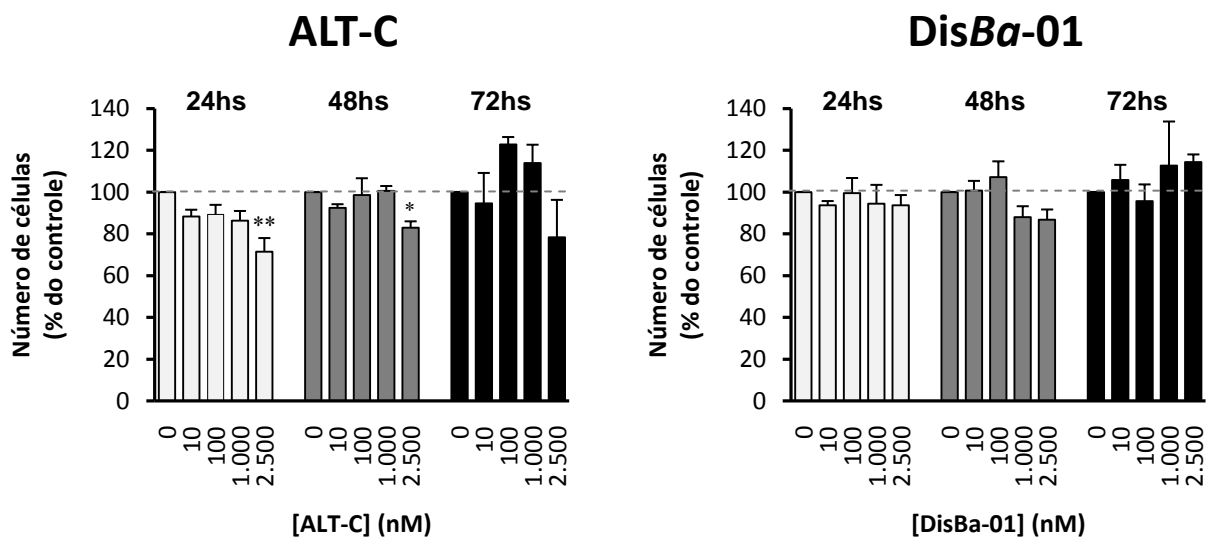


Figura 20 – Efeito de ALT-C (a) e DisBa-01 (b) na proliferação de células MDA-MB-231 aderidas ao colágeno I. As células aderidas ao colágeno foram incubadas com diversas concentrações de ALT-C ou DisBa-01 durante 24, 48 ou 72 horas. Células não tratadas com as desintegrinas foram consideradas controle. Valores de p determinados pelo teste de Dunnett, comparando-se ao controle positivo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.1.2. Fibroblastos humanos

4.1.2.1. Promoção de adesão celular

ALT-C e DisBa-01 foram testadas quanto a sua capacidade de agirem como moléculas de adesão para fibroblastos humanos, os quais foram adicionados também sobre diferentes proteínas da ECM.

Os fibroblastos aderiram a todos os substratos testados quando comparados com ao controle negativo (Figura 21). A adesão ocorreu mais fortemente e de forma semelhante aos três tipos de colágeno, em ALT-C 10 µg/poço e em DisBa-01 em todas as quantidades testadas; e de maneira igualmente menos intensa em fibronectina e em ALT-C 0,1 e 1 µg/poço. Portanto, a adesão ocorreu de forma dependente da dose para ALT-C, mas não para DisBa-01.

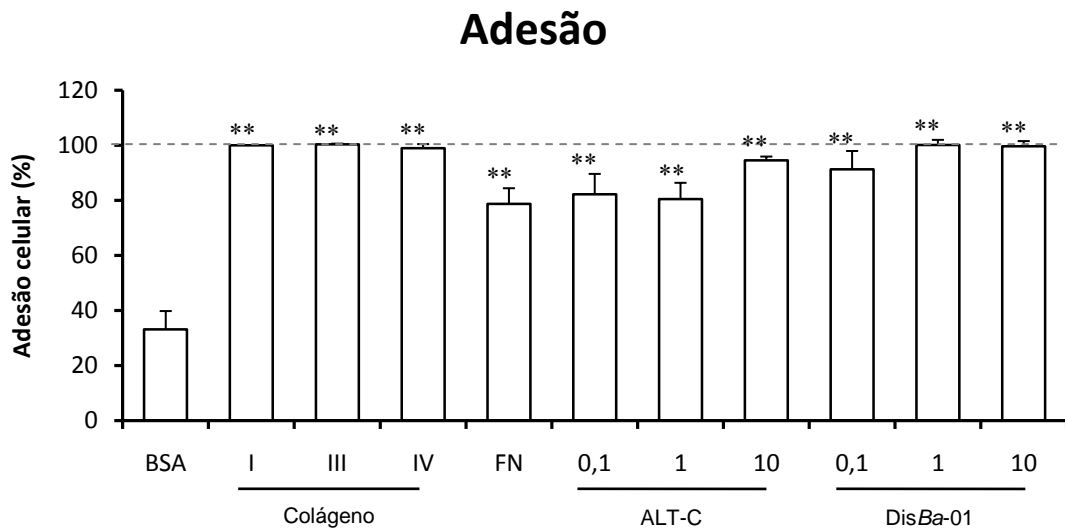


Figura 21 – Efeito de ALT-C e DisBa-01 na adesão de fibroblastos humanos. As células foram adicionadas sobre ALT-C ou DisBa-01 imobilizadas em diversas concentrações. A adesão das células sobre diversas proteínas da ECM. FN: fibronectina. Valores de p determinados pelo teste de Dunnett, comparando-se ao controle negativo. $**p < 0,01$.

4.1.2.2. Inibição de adesão celular

Nos ensaios de inibição da adesão, ALT-C inibiu em 30% a adesão dos fibroblastos ao colágeno na maior concentração testada (10.000nM), ao contrário da *DisBa-01*, que não apresentou efeitos sobre a adesão ao ligante (Figura 22).

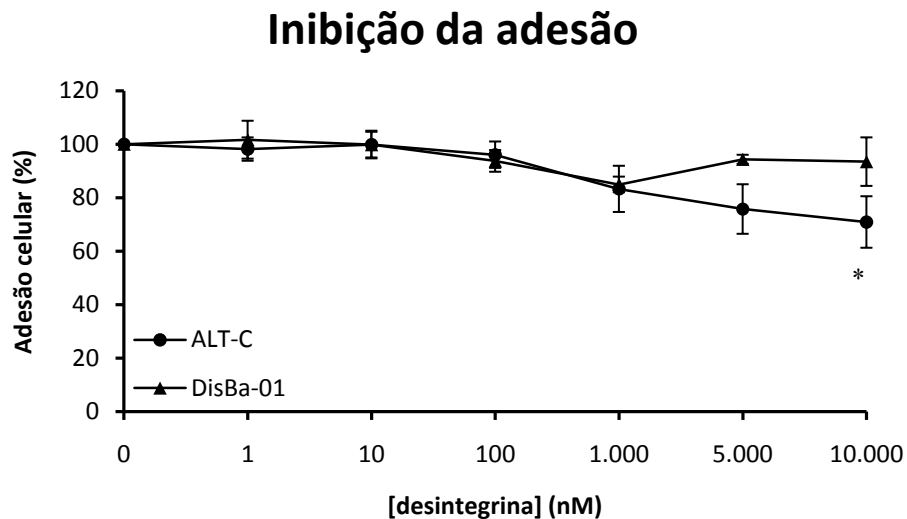


Figura 22 – Efeito de ALT-C e *DisBa-01* na inibição da adesão de fibroblastos humanos ao colágeno I. Células incubadas com diversas concentrações de ALT-C ou *DisBa-01* foram adicionadas sobre colágeno I. Valores de p determinados pelo teste de Dunnett, comparando-se ao controle positivo. * $p < 0,05$.

4.1.2.3. Desadesão/descolamento celular

Os fibroblastos previamente aderidos ao colágeno I não apresentaram desadesão após incubação com ALT-C ou *DisBa-01* (Figura 23).

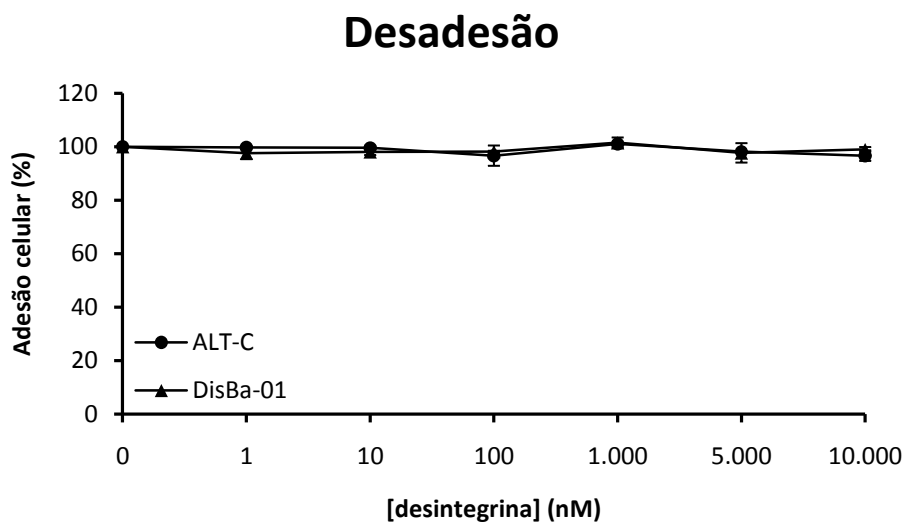


Figura 23 – Efeito de ALT-C e DisBa-01 em fibroblastos humanos previamente aderidos ao colágeno I. Valores de p determinados pelo teste de Dunnett, comparando-se ao controle positivo. * $p < 0,05$.

4.1.2.4. Proliferação/viabilidade celular

Os ensaios de proliferação de fibroblastos mostram que as células incubadas com ALT-C tiveram seu número aumentado em relação ao controle após 48 e 72 horas (figura 24a). Em 48 horas, as células tratadas com ALT-C 100nM aumentaram seu número em 13% e com ALT-C 1.000nM o valor foi de 14%. A indução da proliferação aumentou para 24% e 22% em 72 horas de incubação com ALT-C 100nM e 1.000nM, respectivamente. DisBa-01 não apresentou efeitos sobre a proliferação de células desta linhagem (figura 24b).

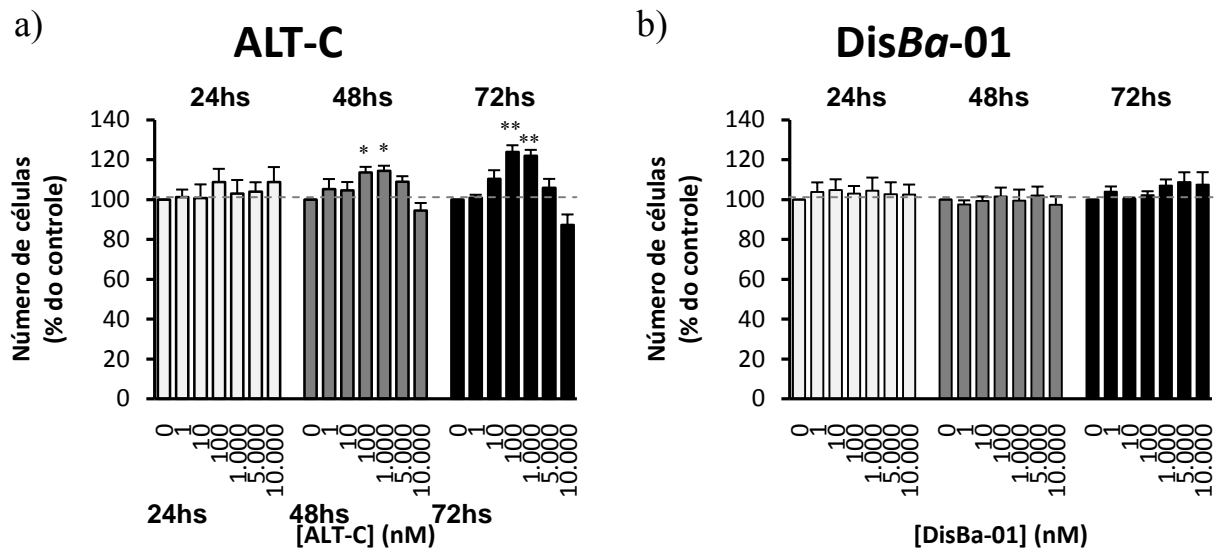


Figura 24 – Efeito de ALT-C (a) e DisBa-01 (b) na proliferação de fibroblastos humanos aderidos ao colágeno I. Valores de p determinados pelo teste de Dunnett, comparando-se ao controle positivo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.1.3. Células de melanoma murino B16F10

Os efeitos de ALT-C e DisBa-01 foram verificados também em outra linhagem tumoral, B16F10 de melanoma murino.

4.1.3.1. Promoção de adesão celular

As células B16F10, assim como as células tumorais de mama e os fibroblastos, foram adicionados sobre ALT-C, DisBa-01 e diversos componentes de ECM.

Todas as proteínas testadas promoveram a adesão das células de melanoma, com as desintegrinas apresentando o efeito nas três concentrações utilizadas (figura 25). A adesão foi mais intensa e de forma semelhante a todas as proteínas da matriz, bem como em ALT-C 10 $\mu\text{g}/\text{poço}$ e DisBa-01 0,1 e 1 $\mu\text{g}/\text{poço}$, ocorrendo de

maneira igualmente menos intensa em ALT-C 0,1 e 1 $\mu\text{g}/\text{poço}$, e DisBa-01 10 $\mu\text{g}/\text{poço}$.

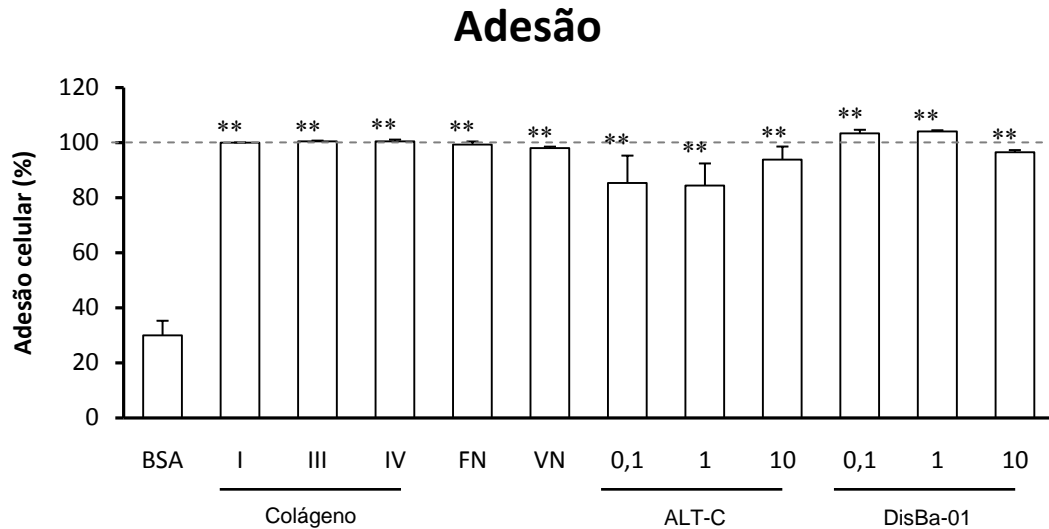


Figura 25 – Efeito de ALT-C e DisBa-01 na adesão de células de melanoma murino B16F10. As células foram adicionadas sobre ALT-C, DisBa-01 ou diversas proteínas da ECM. FN: fibronectina, VN: vitronectina. Valores de p determinados pelo teste de Dunnett, comparando-se ao controle negativo. ** $p < 0,01$.

4.1.3.2. Inibição de adesão celular

ALT-C inibiu a adesão das células de melanoma aos colágenos tipo I e III (Figura 26). A inibição foi verificada para as células incubadas com ALT-C 2.500nM e ocorreu de maneira bastante semelhante para os dois tipos de colágeno, sendo de 51% para o tipo I e 53% para o tipo III. Assim como observado para os outros tipos celulares, DisBa-01 não foi capaz de inibir a adesão ao colágeno.

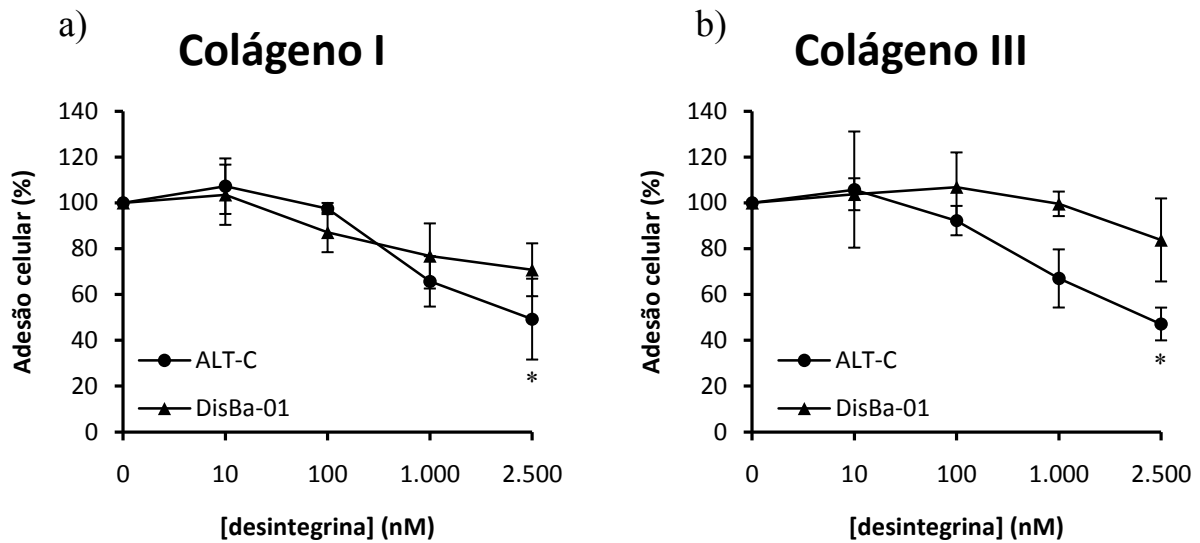


Figura 26 – Efeito de ALT-C e DisBa-01 na inibição da adesão de células de melanoma murino B16F10 aos colágenos tipo I (a) e III (b). Células incubadas com diversas concentrações de ALT-C ou DisBa-01 foram adicionadas sobre colágeno I ou III. Valores de p determinados pelo teste de Dunnett, comparando-se ao controle positivo. * $p < 0,05$.

4.1.3.3. Desadesão/descolamento celular

As células B16F10 ligadas aos colágenos tipo I ou III e posteriormente incubadas com ALT-C permaneceram aderidas (Figura 27a). Por outro lado, DisBa-01 2.500nM foi capaz de desaderir aproximadamente 45% as células aderidas ao colágeno I (Figura 27b).

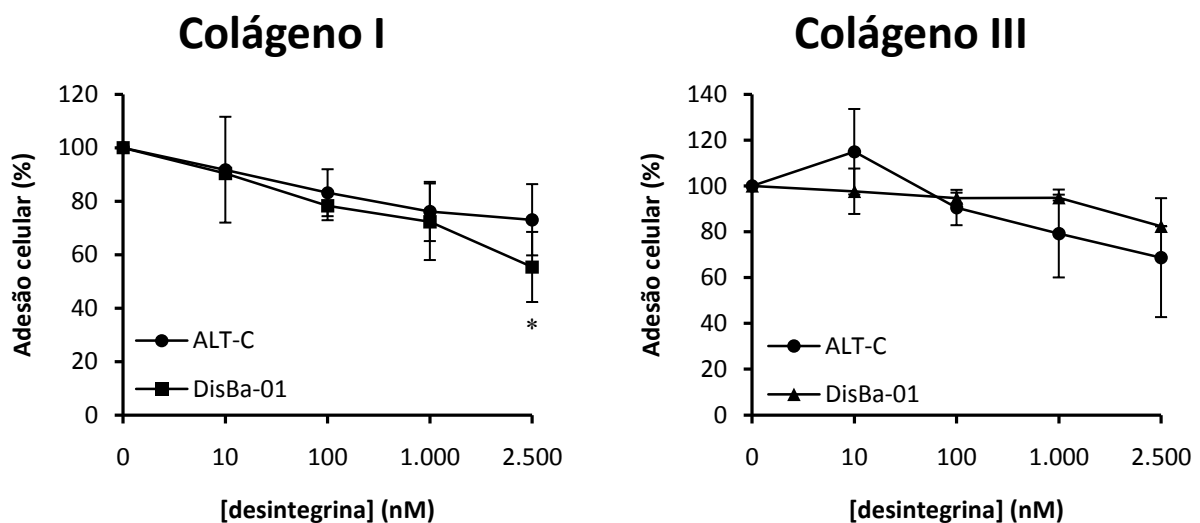


Figura 27 – Efeito de ALT-C e DisBa-01 em fibroblastos humanos previamente aderidos aos colágenos tipo I (a) e III (b). Valores de p determinados pelo teste de Dunnett, comparando-se ao controle positivo. * $p < 0,05$.

4.2. INIBIÇÃO DE ADESÃO CELULAR SOB FLUXO

As desintegrinas ALT-C e DisBa-01 foram submetidas a ensaios de adesão sob condições dinâmicas no qual sangue total contendo células previamente incubadas ou não com as desintegrinas foram submetidos a um fluxo sobre lâminas recobertas por colágeno tipo I ou ECM produzida por HUVECs. A linhagem MDA-MB-231 foi utilizada no experimento.

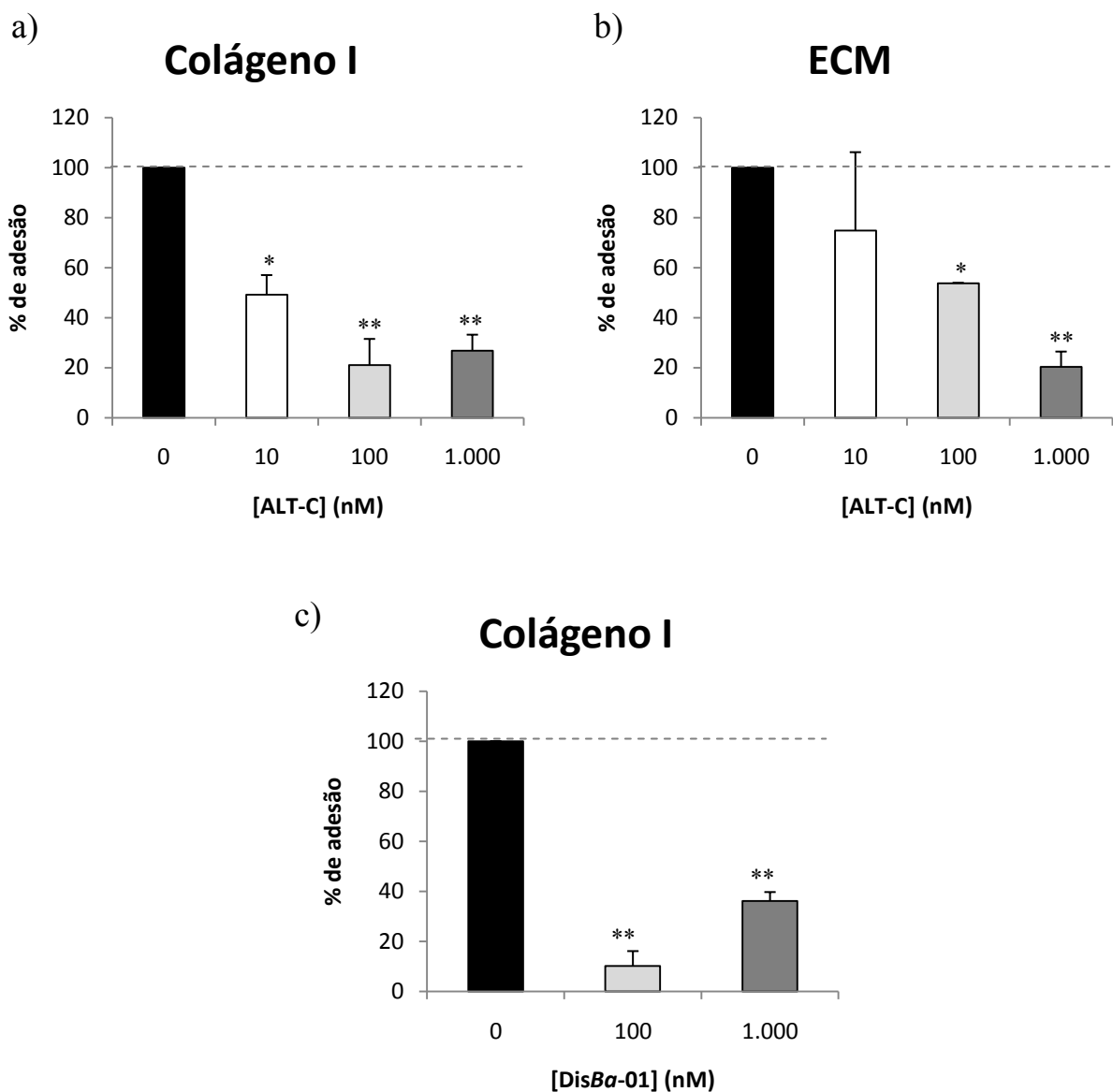


Figura 28 – Efeito de ALT-C (a) na adesão de MDA-MB-231 ao colágeno I e à ECM subendotelial (b) e de DisBa-01 (c) sob fluxo. As células tumorais foram incubadas com diferentes concentrações de ALT-C ou DisBa-01 e então adicionadas ao sangue total. A mistura foi submetida à perfusão sobre lamínulas recobertas por colágeno tipo I ou por ECM produzida por HUVECs. Valores de p determinados pelo teste de Dunnett, comparando-se ao controle. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

ALT-C inibiu a adesão das células MDA-MB-231 ao colágeno I sob condições de fluxo em todas as concentrações testadas, 10, 100 e 1.000nM, com taxas de inibição de 51%, 79% e 74%, respectivamente (Figura 28a).

Nos experimentos de adesão celular sobre ECM, ALT-C 100 e 1.000nM inibiram, respectivamente, 47% e 80% a adesão das células tumorais de mama, não sendo verificado efeitos para ALT-C 10nM (Figura 28b).

DisBa-01, assim como ALT-C, foi capaz de inibir a adesão celular ao colágeno I sob condições de fluxo nas duas concentrações testadas, 100 e 1.000nM. As células incubadas com 100nM da desintegrina recombinante tiveram sua adesão inibida em 90%, enquanto taxa de inibição com DisBa-01 1.000nM foi de 64% (Figura 28c). Não houve diferença estatística entre a inibição causada pelas duas desintegrinas nas concentrações de 100 e 1.000nM.

4.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE INTEGRINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para verificar quais integrinas estão presentes nas células tumorais de mama MDA-MB-231 e nos fibroblastos foram realizados ensaios de citometria de fluxo com anticorpos para algumas integrinas, sendo elas: anti- α 2, anti- α 3, anti- α 4 anti- α 5, anti- α 6, anti- α V, anti- β 1, anti- β 4, anti- α V β 3, anti- α V β 5.

4.3.1. Fibroblastos humanos FGH

Os resultados obtidos por citometria mostram que os fibroblastos humanos utilizados nos ensaios apresentam em sua superfície as subunidades α 3, α 5, α 6, α V

e $\beta 1$ de integrinas, e as integrinas $\alpha V\beta 3$ e $\alpha V\beta 5$. As subunidades $\alpha 2$, $\alpha 4$ e $\beta 4$ não foram detectadas (Figura 29).

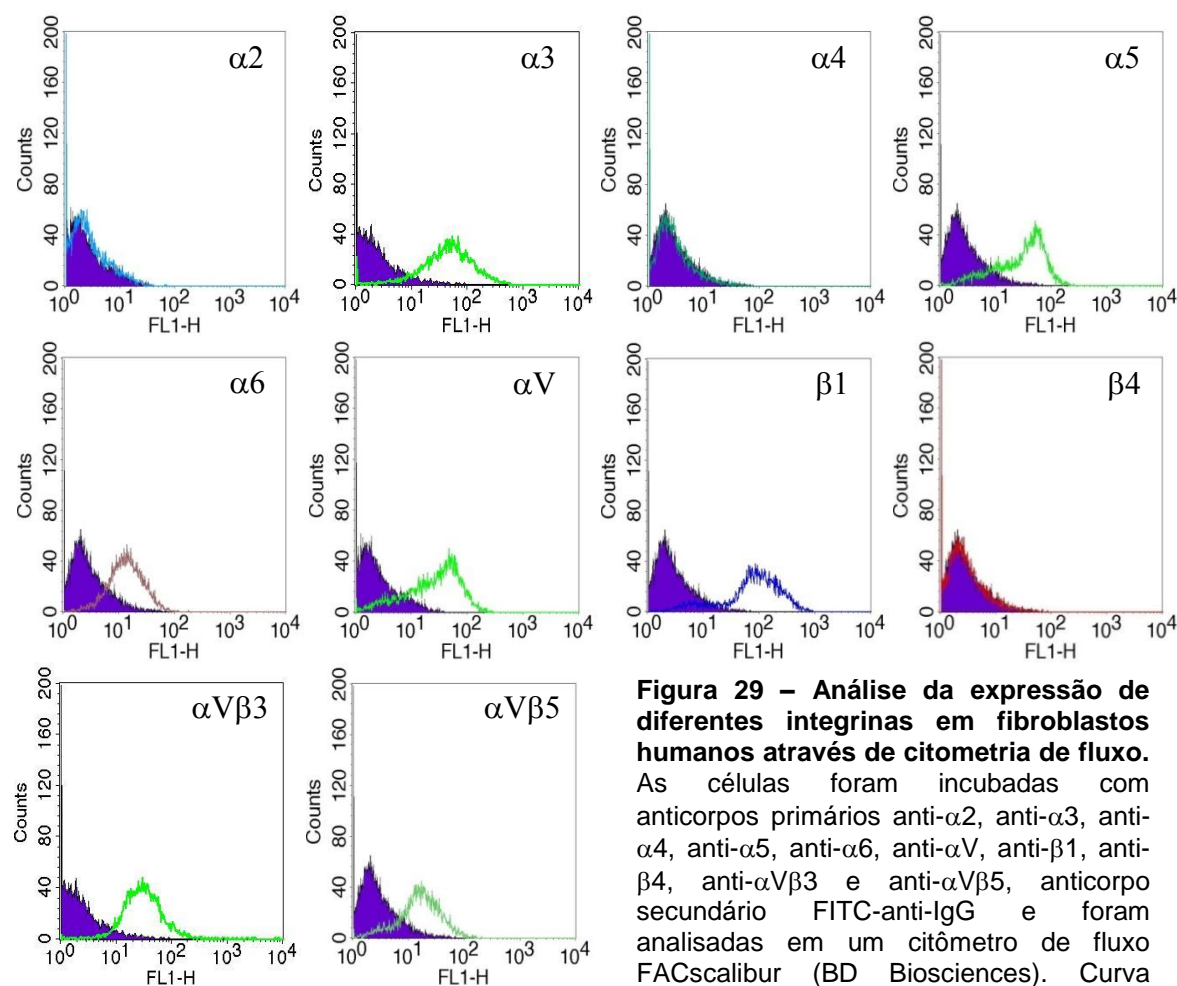


Figura 29 – Análise da expressão de diferentes integrinas em fibroblastos humanos através de citometria de fluxo. As células foram incubadas com anticorpos primários anti- $\alpha 2$, anti- $\alpha 3$, anti- $\alpha 4$, anti- $\alpha 5$, anti- $\alpha 6$, anti- αV , anti- $\beta 1$, anti- $\beta 4$, anti- $\alpha V\beta 3$ e anti- $\alpha V\beta 5$, anticorpo secundário FITC-anti-IgG e foram analisadas em um citômetro de fluxo FACscalibur (BD Biosciences). Curva preenchida: controle.

4.3.2. Células de adenocarcinoma mamário MDA-MB-231

As células tumorais de mama MDA-MB-231 apresentaram reação positiva para as subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\beta 1$, e menos intensa para as subunidades $\alpha 5$, $\alpha 6$ e αV e para as integrinas $\alpha V\beta 3$ e $\alpha V\beta 5$. Não há indícios de expressão das subunidades $\alpha 4$ e $\beta 4$ (Figura 30).

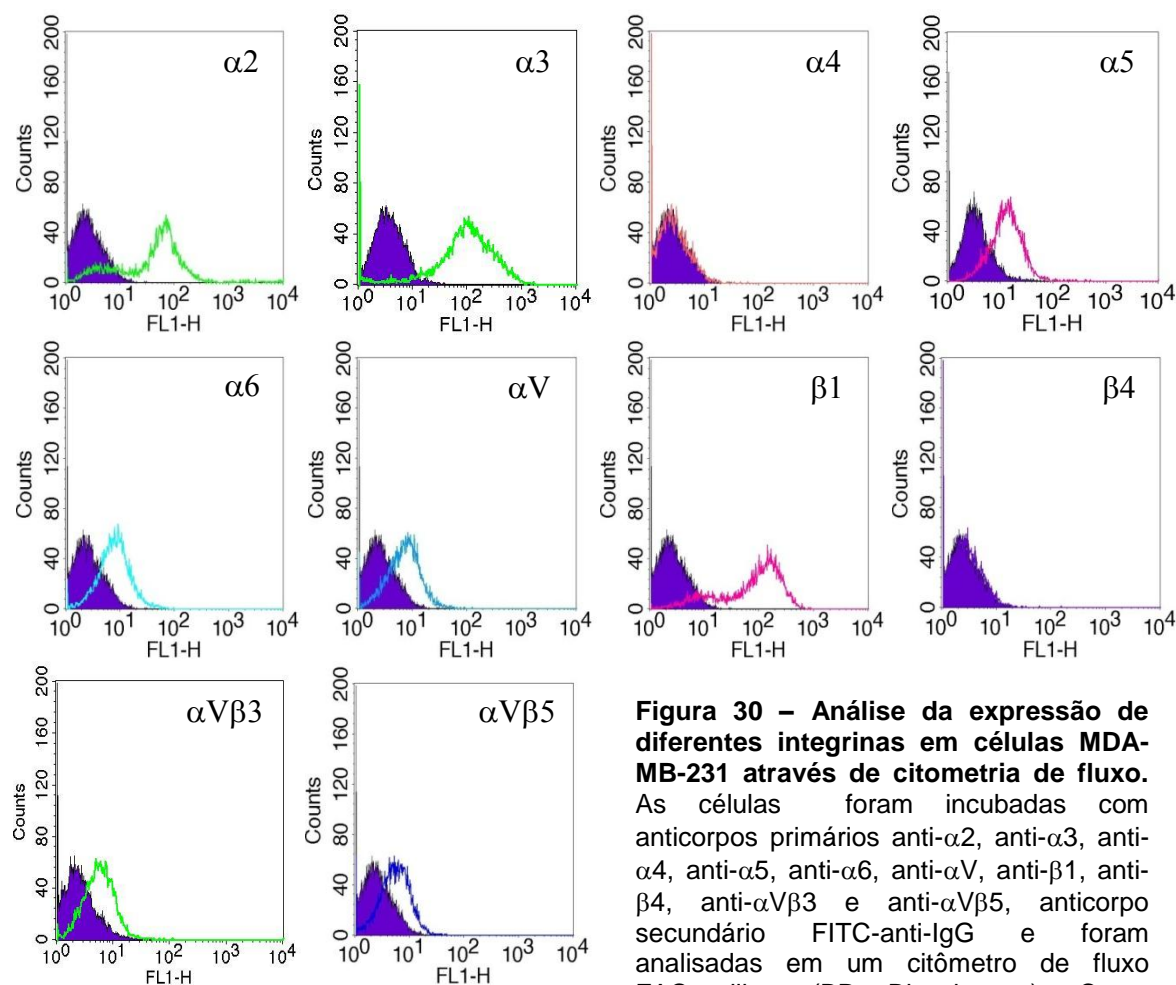


Figura 30 – Análise da expressão de diferentes integrinas em células MDA-MB-231 através de citometria de fluxo. As células foram incubadas com anticorpos primários anti- $\alpha 2$, anti- $\alpha 3$, anti- $\alpha 4$, anti- $\alpha 5$, anti- $\alpha 6$, anti- αV , anti- $\beta 1$, anti- $\beta 4$, anti- $\alpha V\beta 3$ e anti- $\alpha V\beta 5$, anticorpo secundário FITC-anti-IgG e foram analisadas em um citômetro de fluxo FACscalibur (BD Biosciences). Curva preenchida: controle.

4.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

A expressão gênica de VEGF e seus receptores VEGFR-1 e -2 foram verificadas em células tratadas com ALT-C ou DisBa-01. As células utilizadas foram os fibroblastos humanos (análise de VEGF), as linhagens endoteliais HUVEC e HMEC-1 (ambas analisadas para os VEGFRs). Um peptídeo sintético com seqüência baseada no motivo adesivo da ALT-C, ALT-C PEP, também foi testado nas células endoteliais HUVEC.

Para a análise da expressão através de PCR em tempo real, as células foram lisadas para extração do RNA total, o qual foi submetido à eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1% para verificar sua integridade. A presença de bandas íntegras mostra que a extração foi realizada com sucesso, obtendo-se RNA de boa qualidade (figura 31, gel representativo).

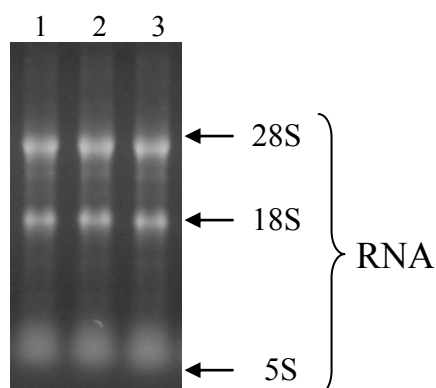


Figura 31 – Análise do RNA em gel de agarose-formaldeído 1%. (1) controle; (2) ALT-C; (3) DisBa-01.

O RNA mensageiro foi transformado em cDNA, que por sua vez foi utilizado nas amplificações para a análise quantitativa da expressão dos genes-alvo. O cDNA foi amplificado para o VEGF, VEGFR-1 e -R2, e para β -actina e GAPDH para controle endógeno. O produto das amplificações foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, confirmando-se o tamanho esperado dos fragmentos amplificados (figura 32, gel representativo).

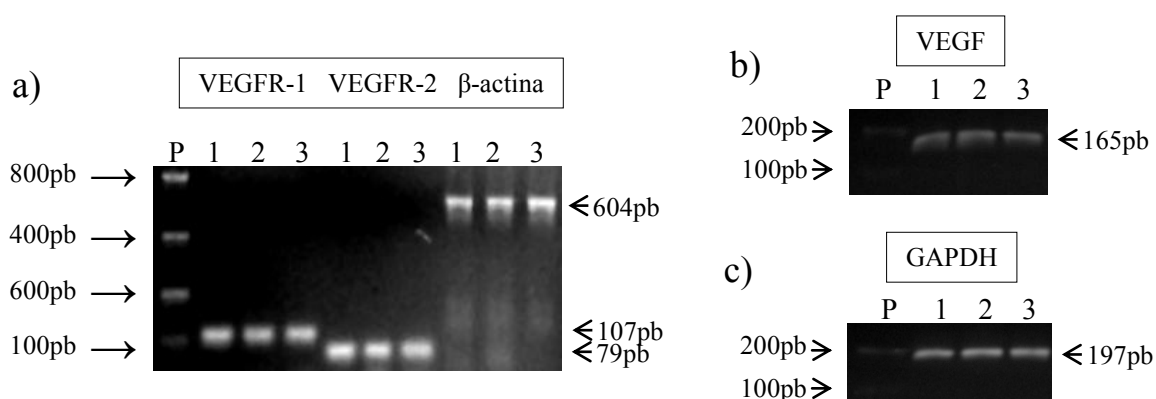


Figura 32 – Análise de produto de PCR quantitativo em gel de agarose 1%. (a) VEGFR-1, VEGFR-2 e β -actina; (b) VEGF; (c) GAPDH. P) Padrão *Low DNA* (Invitrogen); 1) células controle; 2) células tratadas com ALT-C; 3) células tratadas com DisBa-01.

A sequência dos amplicons foi confirmada através do seqüenciamento automático de DNA do produto das reações de amplificação. A sequência resultante comparada com seqüências de nucleotídeos depositadas em um banco de dados, através do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Além disto, possíveis amplificações a partir de DNA genômico contaminante foram evitadas pelo fato de os *primers* para os receptores de VEGF terem sido desenhados para anelamento na junção de diferentes éxons.

4.4.1. Fibroblastos humanos

Nas análises da expressão de VEGF pelos fibroblastos, ALT-C apresentou efeito após os períodos mais longos de incubação, com as alterações ocorrendo sob as menores concentrações (Figura 33). ALT-C 1nM aumentou significativamente os níveis de mRNA para o VEGF em 48 horas, enquanto houve diminuição na incubação com ALT-C 10nM durante 72 horas em relação ao controle.

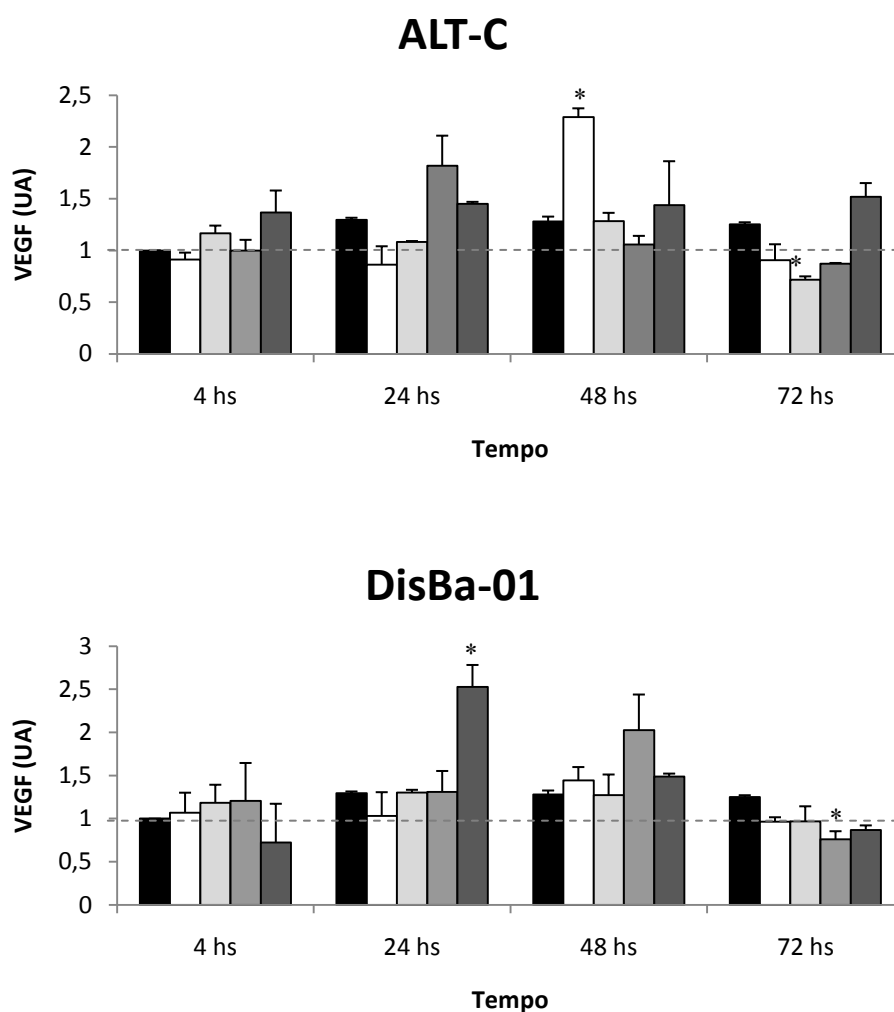


Figura 33 – Análise do efeito de ALT-C e da DisBa-01 na expressão de VEGF em fibroblastos humanos através de PCR em tempo real. Análise estatística dos dados foi feita por ANOVA/teste Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.4.2. Células endoteliais HUVEC

As células endoteliais primárias HUVEC tratadas com ALT-C tiveram expressão alterada dos receptores para o VEGF em diferentes condições de tratamento.

Os VEGFRs -1 e -2 apresentaram modificações em sua expressão nas células tratadas com ALT-C (Figura 34). A expressão do VEGFR-1 foi modulada em 4 e 24 horas de incubação com ALT-C. Após 4 horas, os níveis de mRNA para este

receptor foram superiores ao do controle nas células incubadas com ALT-C 1nM. O nível de expressão do VEGFR-1 dobrou em relação ao controle em 24 horas, porém a modificação ocorreu com a maior concentração testada, ALT-C 100nM.

As alterações nos níveis de expressão do VEGFR-2 são verificadas para todos os períodos de incubação com ALT-C (Figura 34). Em 4 horas, apenas ALT-C 1nM modulou a expressão, elevando-a para quase o dobro da observada para o controle. Após 24 horas, verifica-se aumento da expressão do VEGFR-2 nas células incubadas com ALT-C 1nM e diminuição sob ALT-C 100nM, o mesmo ocorrendo em 48 horas de tratamento (figura 34).

Um peptídeo sintético baseado na sequência da ALT-C, denominado ALT-C PEP, também foi testado na expressão do VEGF e seus receptores em células HUVECs.

ALT-C PEP apresentou efeito na modulação dos níveis de mRNA os receptores de VEGF (Figura 35). A expressão foi modulada apenas nas células incubadas durante 24 horas com uma maior concentração de ALT-C PEP, 100nM, quando o nível do mRNA para ambos os receptores superou o controle em aproximadamente duas vezes (Figura 35).

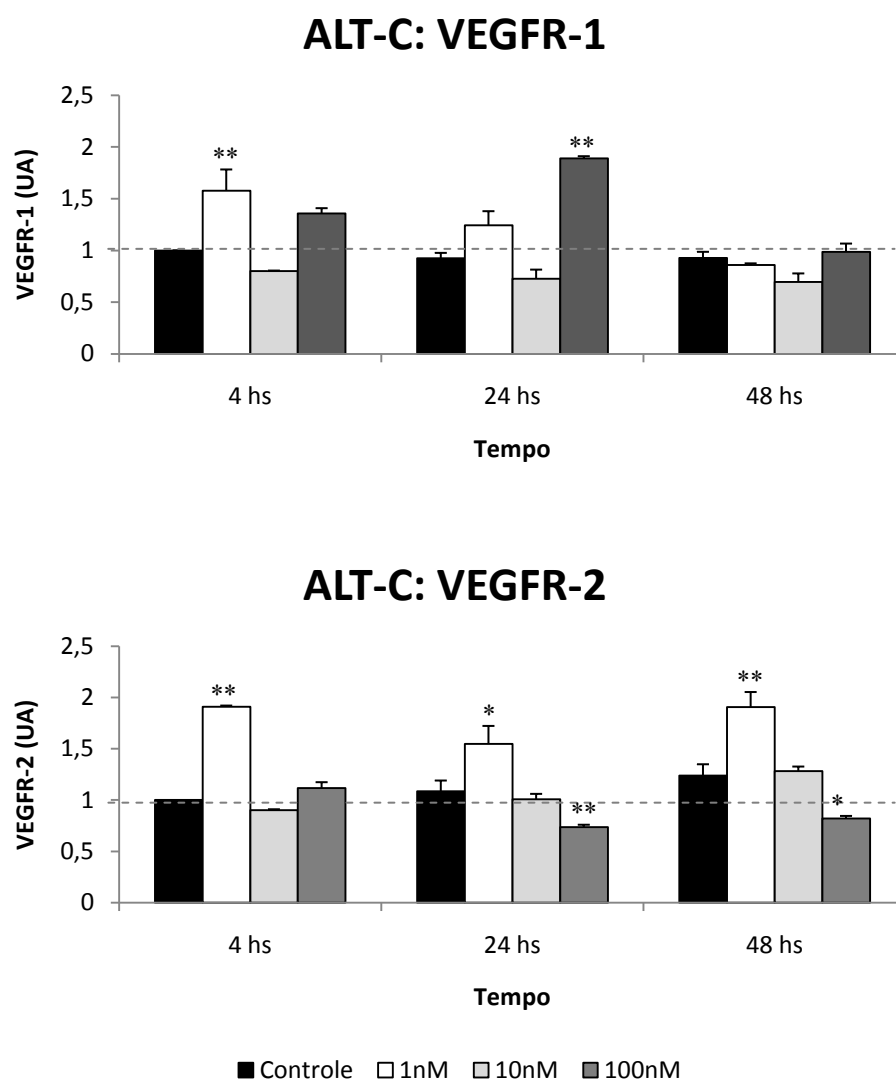


Figura 34 – Análise do efeito de ALT-C na expressão de VEGFR-1 e VEGFR-2 em células HUVEC através de PCR em tempo real. Análise estatística dos dados foi feita por ANOVA/teste Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

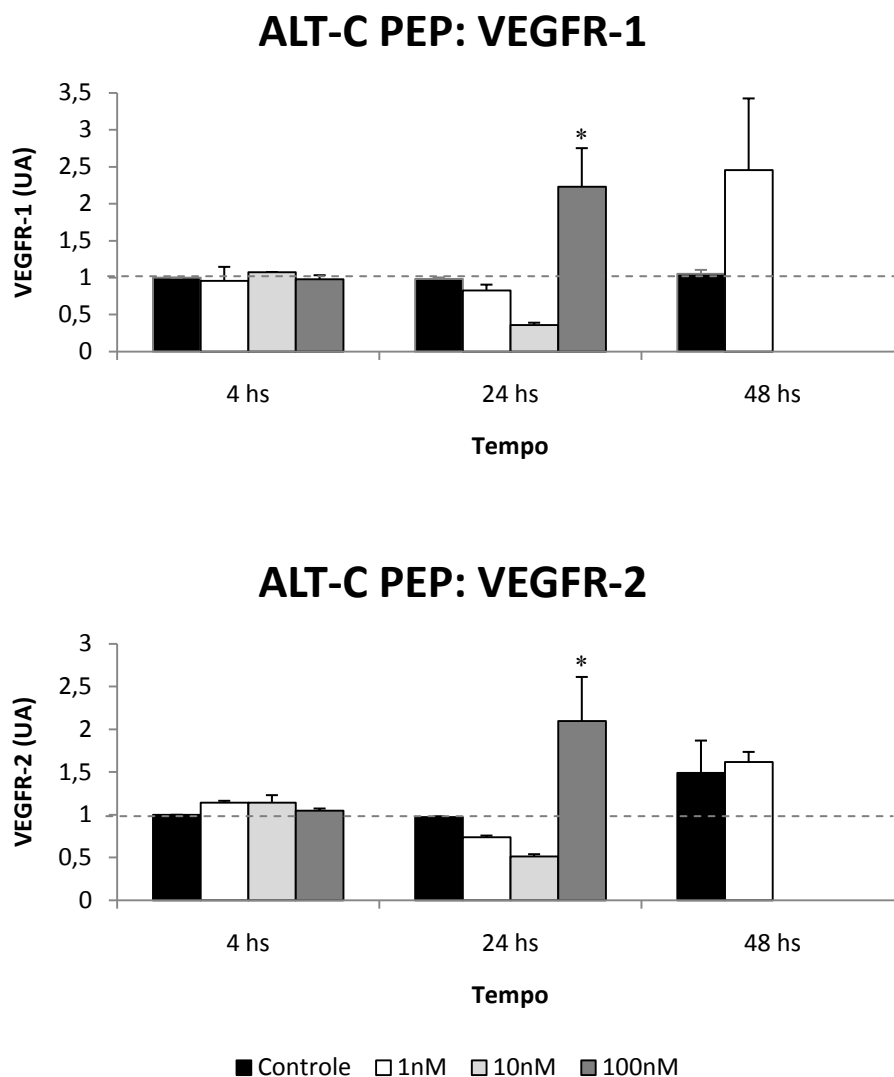


Figura 35 – Análise do efeito de ALT-C PEP na expressão de VEGFR-1 e VEGFR-2 em células HUVEC através de PCR em tempo real. Análise estatística dos dados foi feita por ANOVA/teste Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

DisBa-01 alterou a expressão do VEGF nas células incubadas com 10 ou 100nM da desintegrina.

Entre os dois receptores de VEGF analisados, apenas o VEGFR-1 teve sua expressão modificada na incubação das HUVECs com DisBa-01 (Figura 36). A

alteração ocorreu somente na maior concentração, 100nM, e após 24 horas, quando a desintegrina duplicou os níveis do mRNA para o receptor.

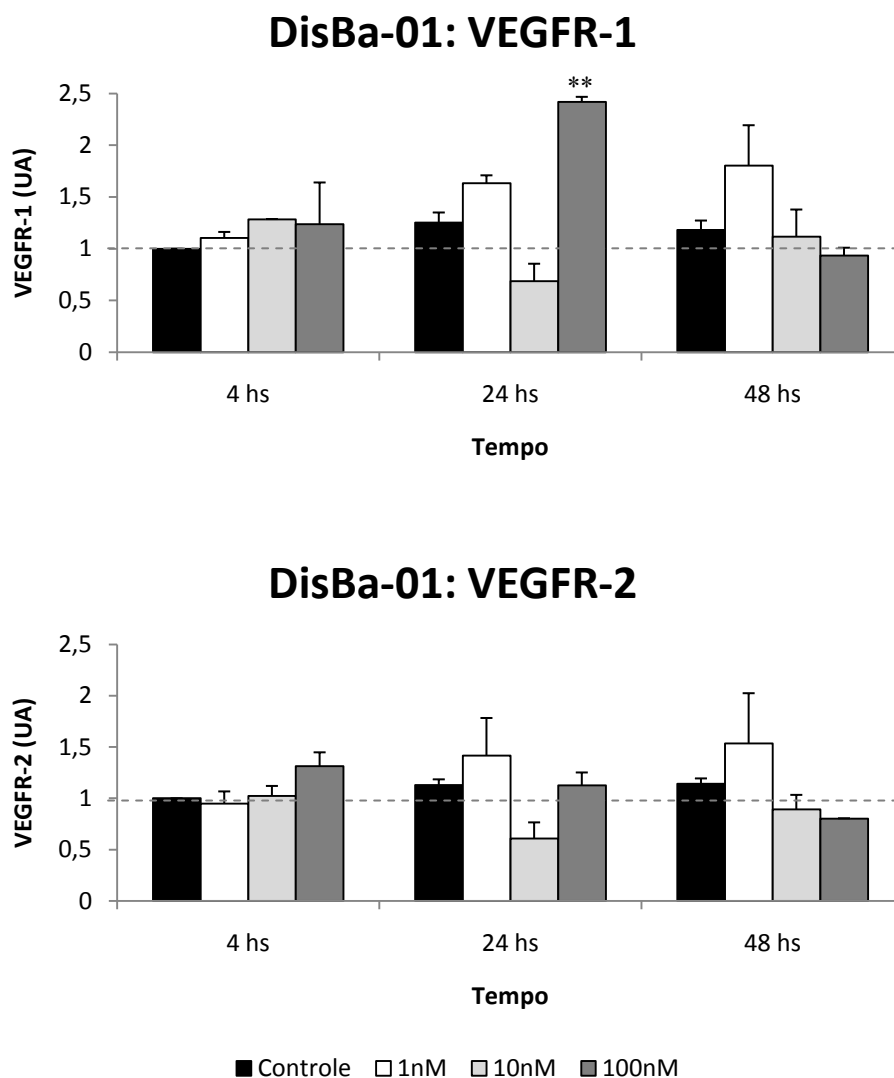


Figura 36 – Análise do efeito de DisBa-01 na expressão de VEGFR-1 e VEGFR-2 em células HUVEC através de PCR em tempo real. Análise estatística dos dados foi feita por ANOVA/teste Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.4.3. Células endoteliais HMEC-1

Nos experimentos com as células endoteliais HMEC-1, os níveis do mRNA para o VEGFR-1 não foram afetados pela adição da ALT-C ao meio de cultura celular (Figura 36). O VEGFR-2, por outro lado, teve sua expressão aumentada nas células incubadas com ALT-C 100nM em 4 horas (Figura 37). O nível de VEGFR-2 superior ao do controle também foi obtido para as células tratadas com ALT-C 1 e 100nM em 48 horas, com aumento de aproximadamente 9 e 2 vezes em relação ao controle, respectivamente (Figura 37).

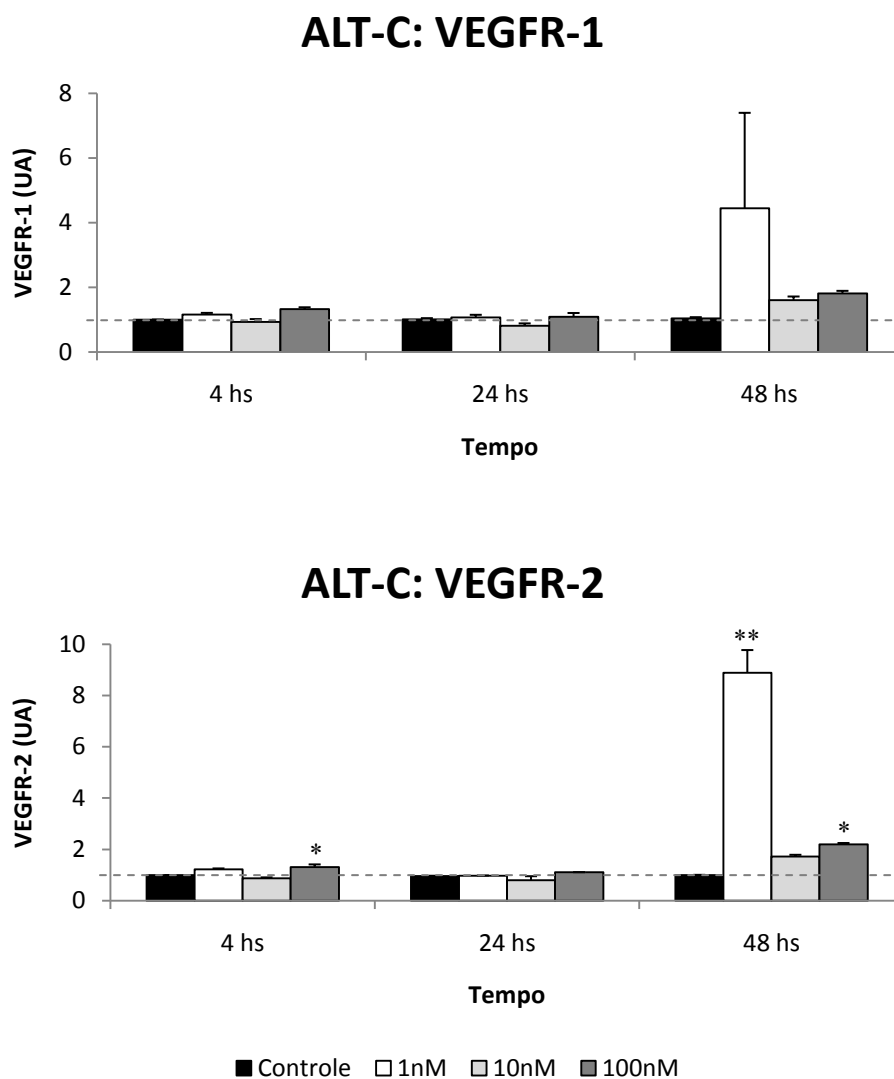


Figura 37 – Análise do efeito de ALT-C na expressão de VEGFR-1 e VEGFR-2 em células HMEC-1 através de PCR em tempo real. Análise estatística dos dados foi feita por ANOVA/teste Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

DisBa-01 foi capaz de modular a expressão do VEGFRs nas células HMEC-1 (Figura 38).

A expressão do VEGFR-1 foi inferior a do controle em todas as células tratadas com DisBa-01 10 e 100nM, diminuindo para aproximadamente metade do observado para o controle (Figura 38). Em 24 horas, a desintegrina em 1nM também foi capaz de diminuir a expressão do VEGFR-2, de maneira semelhante a das duas outras concentrações.

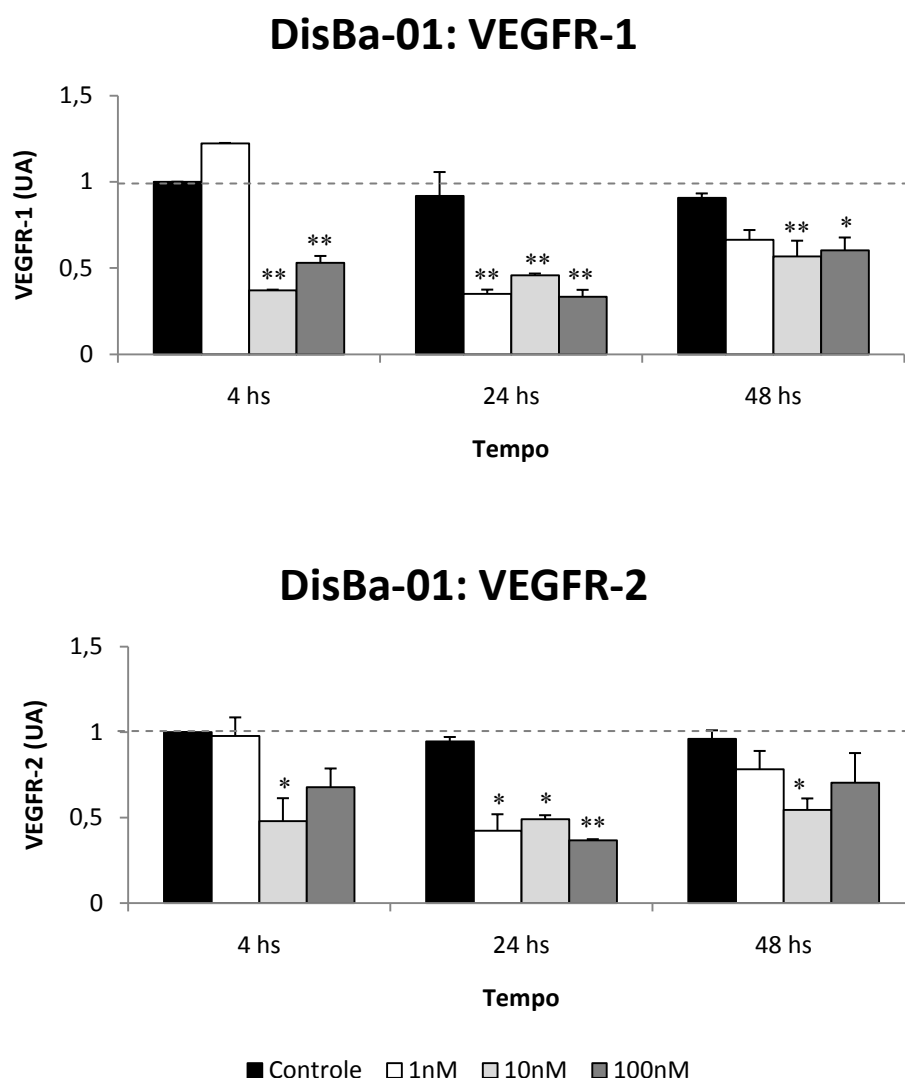


Figura 38 – Análise do efeito de Disba-01 na expressão de VEGFR-1 e VEGFR-2 em células HMEC-1 através de PCR em tempo real. Análise estatística dos dados foi feita por ANOVA/teste Dunnett. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Com relação ao receptor VEGFR-2, em 4 horas de incubação apenas a concentração intermediária de 10nM de DisBa-01 afetou sua expressão, tornando seus níveis duas vezes menor que o do controle (Figura 38). Em 24 horas todas as concentrações da desintegrina diminuíram a expressão do receptor para valores por volta da metade daqueles para o controle, com a maior concentração, 100nM, apresentando efeito mais pronunciado. Assim como verificado em 4 horas, apenas DisBa-01 10nM apresentou efeito na expressão do VEGFR-2.

5. DISCUSSÃO

5.1. ADESÃO CELULAR

O funcionamento normal dos organismos multicelulares depende da coordenação de células e órgãos, sendo fundamental a adesão das células a ECM.

Os processos adesivos possibilitam a interação e comunicação das células com o meio, fonte de diferentes sinais que regulam o comportamento celular. A adesão célula-ECM é essencial para a organogênese durante o desenvolvimento embrionário e vital para a manutenção da integridade tecidual e para as funções dos órgãos no organismo adulto. Assim, alterações na adesão célula-ECM estão freqüentemente associadas a doenças.

Devido ao seu papel importante em condições fisiológicas e patológicas, a adesão célula-ECM é objeto de numerosos estudos nos quais se busca a compreensão das bases moleculares dos mecanismos de regulação da adesão celular e da sua função nos diversos processos biológicos.

As três últimas décadas trazem as principais descobertas sobre os processos adesivos, graças a avanços metodológicos. Entre as informações chave está a identificação das integrinas como uma das principais classes de receptores para proteínas da ECM.

As integrinas têm recebido bastante atenção por sua participação essencial em diversos processos fisiológicos e em situações patológicas, constituindo-se alvos para o desenvolvimento de terapias para o tratamento de diversas patologias como o câncer, umas das condições patológicas mais estudadas.

Em 2008 ocorreriam 12,4 milhões de novos casos de câncer e 7,6 milhões de óbitos pela doença no mundo, segundo a Agência Internacional para Pesquisa em

Câncer (IARC)/OMS (World Report 2008). Destes, os mais incidentes foram o câncer de pulmão (1,52 milhões de novos casos), mama (1,29 milhões) e cólon e reto (1,15 milhões).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2010, apontam que ocorrerão 489.270 novos casos de câncer, valores válidos também para 2011. casos novos de câncer (Estimativa 2010: incidência do câncer no Brasil, www.inca.gov.br). Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e de colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observado na América Latina. De um total de 236.240 casos novos de câncer estimados para os homens, os tumores mais incidentes serão de pele não-melanoma (53 mil casos novos), próstata (52 mil), pulmão (18 mil), estômago (14 mil) e cólon e reto (13 mil). Para o sexo feminino, destacam-se os tumores de pele não-melanoma (60 mil casos novos), mama (49 mil), colo do útero (18 mil), cólon e reto (15 mil) e pulmão (10 mil), de um total de 253.030 novo casos estimados entre as mulheres.

A metástase é a principal causa da falha no tratamento de pacientes com câncer, levando-os a morte. Apesar de sua relevância clínica, o processo metastático é o aspecto menos compreendido da carcinogênese.

O envolvimento de integrinas na disseminação metastática está sob investigação há vários anos (RUOSLAHTI & GIANCOTTI, 1989). Assim como para as células normais, as sinalizações desencadeadas pelas interações destes receptores com componentes da ECM são cruciais para a sobrevivência das células tumorais (HANAHAN & WEINBERG, 2000; WALENTA et al., 2004; BARCELLOS-HOFF et al., 2005; LU et al., 2006). Portanto, as integrinas têm sido alvos importantes na busca de drogas para tratamento de câncer. Neste sentido, as

desintegrinas, pequenas proteínas isoladas de veneno de serpentes, capazes de interagir com as integrinas, são moléculas com potencial para o desenvolvimento de drogas anti-câncer, entre outras doenças que envolvem processos adesivos mediados por integrinas.

Deste modo, diante dos resultados obtidos para as desintegrinas ALT-C e DisBa-01, previamente descritos na introdução desta tese, resolveu-se investigar seus efeitos na adesão de células tumorais e não tumorais a diversos componentes da ECM. As linhagens tumorais utilizadas foram a de adenocarcinoma mamário MDA-MB-231 e a de melanoma murino B16F10.

5.1.1. Células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231

Primeiramente, foram realizados ensaios de promoção de adesão celular a ALT-C e DisBa-01, e a diversos componentes de ECM (colágenos I, III e IV, fibronectina, laminina-1, trombospondina-1 e matrigel) para testar a capacidade adesiva de cada um para as células MDA-MB-231.

ALT-C não foi capaz de agir como molécula de adesão para as células MDA-MB-231, ao contrário da DisBa-01, que promoveu a adesão em todas as quantidades testadas. As células apresentaram maior adesão sobre os colágenos I e III, fibronectina e matrigel (composto principalmente por colágeno e laminina) e sobre DisBa-01 nas maiores concentrações testadas da desintegrina.

Células MDA-MB-231 (altamente metastáticas e invasivas) expressam taxas relativamente altas de $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$ em comparação com células menos agressivas como MCF-7, T47D e ZR75-1 (SHEU et al., 1997; VAN DER et al., 1997). Os ensaios de citometria de fluxo mostraram que a linhagem utilizada apresenta a integrina $\alpha V\beta 3$, embora não muito forte. DisBa-01 interage fortemente com integrinas

$\beta 3$, como $\alpha 11\beta 3$ e $\alpha V\beta 3$ (KAUSKOT et al., 2008; RAMOS et al., 2008). Assim, provavelmente a desintegrina recombinante interagiu com as células tumorais através de integrina mesmo esta sendo expressa em quantidade moderada.

A família das integrinas contém pelo menos quatro receptores para colágenos: $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ (CAMPER et al., 1998) e $\alpha 11\beta 1$ (VELLING et al., 1999). A integrina $\alpha 2\beta 1$ interage com uma variedade de colágenos (KAMATA & TAKADA, 1994; KERN et al., 1994; TULLA et al., 2001), sendo o principal receptor para o tipo I e outros colágenos fibrilares (CALDERWOOD et al., 1997; GARDNER et al., 1999; NYKVIST et al., 2000; TULLA et al., 2001; ZHANG et al., 2003).

Análises da expressão de integrinas por citometria de fluxo confirmaram que as células tumorais de mama apresentam as subunidades $\alpha 2$ e $\beta 1$, portanto, justificando a adesão observada para os colágenos fibrilares I e III e ao matrigel, composto principalmente por colágeno e laminina.

É importante salientar que o conjunto das integrinas expressas em cada tipo celular determina a ligação e a afinidade das integrinas aos ligantes. Células expressando todas as integrinas ligantes de colágeno exceto $\alpha 2\beta 1$ podem se aderir a colágenos fibrilares. Assim, além da integrina $\alpha 2\beta 1$, uma combinação de outros receptores para colágeno são capazes de mediar a adesão a essa proteína (TULLA et al., 2001; ZHANG et al., 2003). Além disso, a função das integrinas pode variar entre os diferentes tipos celulares. Em algumas células, as integrinas $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha V\beta 3$, principais receptoras para fibronectina e vitronectina, respectivamente, são capazes de interagir com matrizes de colágeno (GOTWALS et al., 1996; RACINE-SAMSON et al., 1997; COOKE et al., 2000; GRUNDSTROM et al., 2003). Em MDA-MB-231, entretanto, a adesão aos colágenos I, III e IV é exclusivamente mediada por integrinas $\beta 1$, com 60-80% via $\alpha 2\beta 1$ (LICHTNER et al., 1998).

A promoção da adesão pela fibronectina provavelmente ocorreu através da integrinas $\alpha 5\beta 1$, cuja presença foi detectada nas células tumorais de mama através de citometria de fluxo. A integrina $\alpha 5\beta 1$ é o principal receptor para a fibronectina.

As células tumorais foram capazes de aderir fortemente também ao colágeno IV, porém de forma um pouco inferior comparada à apresentada pelos outros colágenos, pela fibronectina e pelo matrigel. Isso poderia ser explicado pelo fato da linhagem utilizada não expressar o principal receptor para este tipo de colágeno, a integrina $\alpha 1\beta 1$. Entretanto, estudos mostram que esse ligante é capaz de interagir com $\alpha 2\beta 1$, mas com menor afinidade do que para os colágenos fibrilares, como os tipos I e III (VANDENBERG et al., 1991; KERN et al., 1993; CALDERWOOD et al., 1997; NYKVIST et al., 2000; TULLA et al., 2001; ZHANG et al., 2003), explicando os resultados observados no ensaio de promoção da adesão.

Das proteínas de ECM testadas, apenas a laminina-1 e a trombospondina-1 não promoveram a adesão das células de carcinoma mamário em comparação com o controle negativo. Células desta linhagem mostraram capacidade invasiva através de laminina-1 *in vitro*, entretanto, estudos mostraram que a laminina-1 interage pouco ou é incapaz de se ligar as integrinas $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 3\beta 1$ (MAEMURA et al., 1995; LICHTNER et al., 1998), esta última tendo sido confirmada nas células utilizadas através de citometria de fluxo. Assim, a função de $\alpha 2\beta 1$ como receptor para laminina pode ser regulada durante a progressão maligna de células de carcinoma de mama. Uma contribuição reduzida da $\alpha 2\beta 1$ na ligação celular à laminina parece estar associada com o aumento da malignidade em células de mama. Além disso, o uso de anticorpos mostrou que $\alpha 2\beta 1$ media a ligação a laminina-1 em algumas células, mas não em outras (ELICES & HEMLER, 1989).

Embora diversas integrinas tenham sido descritas como receptores para a laminina-1, como $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ (PATARROYO et al., 2002), a principal integrina que interage com essa proteína da matriz nas células MDA-MB-231 é a $\alpha 6\beta 4$ (PEROU et al., 2000). Tais células são descritas apresentando altos níveis da integrina $\alpha 6\beta 4$, entretanto os resultados obtidos através de citometria de fluxo foram positivos para a subunidade $\alpha 6$, porém a subunidade $\beta 4$ não foi detectada. As análises de citometria mostraram que as células utilizadas apresentam as subunidades $\alpha 2$, $\alpha 6$ e $\beta 1$, as quais poderiam estar envolvidas na adesão a laminina-1. Estudos mostraram que a laminina pode se ligar a integrina $\alpha 2\beta 1$, entretanto isso ocorre de maneira fraca (KERN et al., 1993). Assim, a falta da principal integrina presente nesta linhagem pode ser responsável pela fraca ligação celular a laminina-1.

Os ensaios mostraram que as células MDA-MB-231 também não foram capazes de aderir a trombospondina-1. Embora a integrina $\alpha V\beta 3$ seja importante para a adesão de diversos tipos celulares a este substrato, a adesão de células de carcinoma mamário a este ligante não é mediada por essa integrina e sim por $\alpha 3\beta 1$ (CHANDRASEKARAN et al., 1999), confirmada pela citometria das células utilizadas neste trabalho. Entretanto, apesar de MDA-MB-231 expressar $\alpha 3\beta 1$, esta é mantida em um estado inativo ou parcialmente ativado, podendo ser completamente ativada por estímulos exógenos como soro (os ensaios de adesão foram realizados sem soro) e insulina, ou pela adesão celular a vitronectina através de $\alpha V\beta 3$. As integrinas $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$ também participam da adesão a trombospondina-1 em outras células, mas não em MDA-MB-231 (CHANDRASEKARAN et al., 2000; KVANSAKUL et al., 2004).

Após verificar os efeitos de ALT-C e DisBa-01 immobilizadas na interação com as células da linhagem MDA-MB-231, foram realizados ensaios para verificar se as desintegrinas seriam capazes de inibir a adesão das células tumorais a diversas proteínas da ECM, ao matrigel e a própria ECM produzida por HUVEC.

ALT-C foi capaz de inibir a adesão de MDA-MB-231 a todos os tipos de colágeno, com efeito mais forte observado sobre o colágeno I e menos proeminente ao tipo IV. O colágeno tipo I é o principal ligante da integrina $\alpha 2\beta 1$, com a qual ALT-C é capaz de interagir em diversas células, normais e tumorais (SOUZA et al., 2000) e através da qual a desintegrina interagiu também com as células tumorais de mama.

Levando-se em conta que as células MDA-MB-231 apresentaram expressão da integrina $\alpha 2\beta 1$, através da qual interagem com os colágenos tipos I, III e IV, e que ALT-C é capaz de se ligar a esse receptor em diversos tipos celulares (SOUZA et al., 2000), provavelmente a inibição da adesão aos colágenos causada por ALT-C provavelmente ocorreu através de $\alpha 2\beta 1$. Salienta-se, ainda, que sendo o colágeno I o ligante mais forte de $\alpha 2\beta 1$, é possível que o efeito inibitório de ALT-C, apresentando-se mais forte nos ensaios com esse tipo de colágeno, tenha ocorrido no mesmo sítio de ligação na integrina ao qual se liga a proteína da ECM.

ALT-C também inibiu a adesão de MDA-MB-231 a fibronectina, entretanto isso ocorreu de maneira mais fraca com relação à observada para os colágenos (todos os tipos). Como ALT-C não interage com a integrina $\alpha 5\beta 1$, o principal receptor para a fibronectina e que foi detectado nessas células, é possível que sua interação com a célula tenha ativado um mecanismo de trans-dominância (DIAZ-GONZALEZ et al., 1996) entre as integrinas $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$, com a primeira inibindo a adesão da segunda a fibronectina.

Outra possibilidade é que a adesão destas células tumorais de mama estas células à fibronectina seja mediada por outras integrinas além de $\alpha 5\beta 1$. A adesão de MDA-MB-231 foi apenas parcialmente inibida por anticorpos anti- $\alpha 5$ e anti- $\beta 1$, sugerindo que outras integrinas podem participar da adesão dessas células a fibronectina, ainda que indiretamente (BARTSCH et al., 2003). Nossos resultados mostram que as células aderiram de maneira igualmente forte ao colágeno I e a fibronectina, porém as análises por citometria mostraram que as células MDA-MB-231 expressam a subunidade $\alpha 5$ de maneira menos intensa que $\alpha 2$. Além disso, estudos mostraram que a integrina $\alpha 3\beta 1$ está envolvida no aumento da adesão de células metastáticas de mama a fibronectina de linfonodos e no espalhamento sobre substratos recobertos por esse substrato, sendo que $\alpha 5\beta 1$ não contribuiu para o aumento da adesão (TAWIL et al., 1996). A expressão de $\alpha 5$ foi inferior também a da subunidade $\alpha 3$. Assim, é possível que a ligação de tais células a fibronectina tenha ocorrido através de outras integrinas além da $\alpha 5\beta 1$, como por exemplo a integrina $\alpha 3\beta 1$.

A adesão das células tumorais de mama a laminina-1 também foi inibida por ALT-C. Esta desintegrina-*like* tem se mostrado específica para a interação com as células através da integrina $\alpha 2\beta 1$ (SOUZA et al., 2000). Desta forma, supondo-se que a fraca adesão das MDA-MB-231 a este ligante de matriz tenha ocorrido pela ligação a $\alpha 2\beta 1$, ALT-C teria inibido a adesão celular através da interação com essa integrina, o que ocorreu mesmo em baixas concentrações. Entretanto, a única taxa de inibição comparável a obtida com os colágenos, mas ainda inferior, foi obtida com a maior concentração de ALT-C, 10.000nM. Assim, as células poderiam estar ligadas a laminina-1 por outra integrina, como a $\alpha 7\beta 1$ (não testada na citometria), e os efeitos observados para ALT-C seriam resultantes da fraca interação das células

mas não necessariamente ligadas através da $\alpha 2\beta 1$. Tais resultados corroboram dados anteriores em que ALT-C mostrou interação seletiva para a integrina $\alpha 2\beta 1$ (SOUZA et al., 2000).

Embora a adesão das MDA-MB-231 a trombospondina tenha sido fraca de forma a não ser diferente estatisticamente do controle negativo, ALT-C não inibir a adesão a esse substrato.

Além de observar os efeitos das desintegrinas na adesão a proteínas da ECM separadamente, foram feitos ensaios utilizando matrigel e ECM produzida por HUVEC. ALT-C inibiu a adesão das células tumorais de mama a ambos, o que ocorreu apenas sob sua maior concentração testada (10.000nM). O matrigel utilizado (BD Matrigel™ Matrix) é composto principalmente por colágeno e laminina. Assim, ALT-C tem mostrado maior potencial inibitório para o colágeno, apenas a maior dose inibiu a adesão ao matrigel.

A matriz produzida por HUVECs é composta por colágenos tipos I, III, IV e VI, fibronectina, laminina, trombospondina e fator Von Willebrand (BONNEFOY et al., 2001), havendo, portanto, componente ao qual ALT-C não inibiu a adesão, a trombospondina; inibiu, porém em dose mais alta, a laminina; e um componente não testado, o fator Von Willebrand. Desta forma, o efeito inibitório de ALT-C apenas em alta dose pode ser devido à composição da matriz produzida.

Um ensaio ainda não realizado é o de promoção da adesão de MDA-MB-231 sobre a matriz subendotelial, importante para comparação com os componentes de matriz testados isoladamente, além de ser importante também a identificação da porcentagem de cada componente da matriz na sua composição.

Embora tenha promovido a adesão das células MDA-MB-231, DisBa-01 não foi capaz de inibir a adesão das células MDA-MB-231 as proteínas da ECM testadas individualmente.

DisBa-01 tem mostrado especificidade para a integrina $\beta 3$, de acordo com experimentos anteriores envolvendo modelagem molecular e estudos *in silico*, seus efeitos inibitórios ao colágeno sob fluxo poderiam continuar a ser explicados por sua interação com a integrina $\alpha V\beta 3$ levando-se em conta que a função das integrinas pode variar entre os diferentes tipos celulares. Estudos mostraram que $\alpha V\beta 3$, principal receptora para a vitronectina, é capaz de interagir com matrizes de colágeno (GOTWALS et al., 1996; RACINE-SAMSON et al., 1997; COOKE et al., 2000; GRUNDSTROM et al., 2003)

Em estudos testando a inibição da adesão desta mesma linhagem tumoral de mama sobre a vitronectina, DisBa-01 também não foi capaz de inibir a adesão embora interaja com $\alpha V\beta 3$, cujo principal ligante é a vitronectina (RAMOS et al., 2008). O mesmo estudo, porém, demonstrou que esta desintegrina-RGD é capaz de inibir a adesão de células tumorais B16F10 e endoteliais HMEC-1 a vitronectina (RAMOS et al., 2008). As análises de citometria feitas neste estudo mostraram que a MDA-MB-231 não apresentava a integrina $\alpha V\beta 3$ ao contrario das duas outras linhagens, sugerindo aos autores que DisBa-01 não teria inibido a adesão de um tipo celular mas sim dos outros dois pela presença da integrina em cada um deles. As análises mostradas no presente estudo, porém, mostram que há expressão da integrina $\alpha V\beta 3$, embora baixa, nas MDA-MB-231. Portanto, será necessário repetir os experimentos de inibição a vitronectina para verificar se a desintegrina será capaz de inibir a adesão no caso da presença da integrina com a qual interage.

Um resultado que chama a atenção é aquele referente à inibição ao colágeno III. DisBa-01 não só não foi capaz de inibir sua adesão como reforçou a interação das células com o substrato em relação as células não tratadas. É possível que a forte interação da desintegrina com a integrina $\alpha V\beta 3$ presente nestas células, ainda que em pequena quantidade, tenha ativado algum mecanismo de adesão para o colágeno (já que $\alpha V\beta 3$ não está entre os receptores para o colágeno), reforçando a adesão.

Assim como observado para ALT-C, DisBa-01 inibiu a adesão ao matrigel. Por não interagir com os receptores para o colágeno, é possível que a interação da DisBa-01 com a célula tenha ativado um mecanismo de trans-dominância (DIAZ-GONZALEZ et al., 1996) entre as integrinas $\alpha V\beta 3$ e $\alpha 2\beta 1$, com a primeira inibindo a adesão da segunda ao colágeno.

Conforme já citado, a adesão célula-ECM é um fator essencial para a homeostase celular. A perda da ancoragem celular pode levar a um tipo específico de apoptose (morte celular) conhecido como “anoikis”.

A anoikis é a apoptose induzida pela perda de adesão celular ou adesão inapropriada (FRISCH & FRANCIS, 1994). Este tipo de apoptose é importante no desenvolvimento, na homeostase tecidual e em diversas doenças (DANIAL & KORSMEYER, 2004; GILMORE, 2005).

As células de um tecido requerem adesões a ECM específicas, sendo que o tipo errado de ECM circundante pode ter as mesmas conseqüências da falta de matriz. As integrinas aderidas a uma determinada ECM ativam vias de sobrevivência celular que permitem as células determinar se ela está no seu meio adequado. No caso de adesão inadequada, os sinais corretos de sobrevivência não são disparados pelas integrinas e as células são levadas a anoikis (FRISCH & SCREATON, 2001).

A resistência a anoikis é uma das características clássicas das células metastáticas, especialmente devido ao fato que o crescimento independente de ancoragem é uma etapa crucial durante a tumorigênese e, particularmente, durante o espalhamento metastático das células cancerosas (FRISCH & FRANCIS, 1994; ZHU et al., 2001; RAMACHANDRA et al., 2002). Assim, diversas pesquisas buscam o desenvolvimento de terapias que possam reverter a resistência das células tumorais a anoikis .

A capacidade das desintegrinas de desaderir as células tumorais de mama previamente aderidas ao colágeno também foi testada. ALT-C foi capaz de desaderir parte das células, enquanto DisBa-01 não apresentou efeitos. Sabendo-se que a perda da ancoragem pode causar anoikis, foram realizados ensaios de viabilidade celular.

ALT-C foi capaz de diminuir a proliferação das células tumorais previamente aderidas ao colágeno I. Tanto a diminuição na viabilidade como a indução de descolamento das células MDA-MB-231 foram causados pela mesma concentração de ALT-C (2.500nM). Assim, sugere-se que ALT-C provoca a desadesão celular das células tumorais de mama, causando anoikis. O efeito de ALT-C na diminuição da viabilidade foi dependente do tempo de incubação, em que o efeito mais pronunciado foi observado em 24 horas, decrescendo após 48 horas até não haver mais efeito em 72 horas. É importante salientar que milhões de células por grama de tumor podem ser liberadas no sistema sanguíneo ou linfático diariamente (BUTLER & GULLINO, 1975) e, embora ainda não existam dados concretos sobre a fração de células que coloniza sítios secundários com sucesso, todos os estudos mostram que a maioria das células que atravessa a vasculatura falha nessa etapa.

DisBa-01 não apresentou efeitos sobre a viabilidade de células desta linhagem. Estudos anteriores mostraram que a desintegrina-RGD também não alterou a viabilidade destas células quando previamente aderidas a vitronectina (RAMOS et al., 2007), embora tenham sido testadas quantidades de DisBa-01 25 vezes inferiores às utilizadas sobre o colágeno.

5.1.1.1. Adesão das células MDA-MB-231 sob fluxo

O processo metastático envolve etapas nas quais a adesão celular é essencial, já que as células tumorais devem interagir com as células adjacentes e com os componentes da ECM e BM para desencadear sinalizações de sobrevivência mediadas por integrinas em contato com os componentes da matriz (HANAHAN & WEINBERG, 2000; WALENTA et al., 2004; BARCELLOS-HOFF et al., 2005; LU et al., 2006)

Durante a fase hematogena da metástase, as células tumorais ficam expostas a forças mecânicas e componentes do sangue que podem afetar a sobrevivência tumoral na circulação e seu extravasamento (WEISS, 1990). Para que consigam colonizar sítios secundários, as células tumorais presentes na circulação devem ser capazes de interagir com a parede dos vasos e atravessá-la. Tal processo adesivo é mediado principalmente por integrinas e reforçado por interações com plaquetas (HONN & TANG, 1992). Uma cooperação ocorre entre as integrinas α IIb β 3 plaquetária e α V β 3 tumoral para promover a adesão a matriz subendotelial sob fluxo (GOMES et al., 2004).

A adesão tumoral à parede dos vasos sanguíneos causa a retração do endotélio e exposição das moléculas da matriz subendotelial, que podem interagir com as células tumorais e/ou com as plaquetas. Para verificar os efeitos de ALT-C e

DisBa-01 na adesão de células MDA-MB-231 sob fluxo, foram realizados ensaios *in vitro* que mimetizam as condições fisiológicas da circulação sanguínea, com o fluxo do sangue total contendo as células tumorais tratadas ou não com as desintegrinas em contato com lâminas recobertas por colágeno tipo I ou ECM produzida por HUVECs.

ALT-C inibiu a adesão das células MDA-MB-231 ao colágeno I sob condições de fluxo em todas as concentrações testadas, 10-1.000nM. A inibição da adesão das células tratadas com ALT-C foi mais forte com a maior concentração da desintegrina (1.000nM). Já nos ensaios de adesão sob fluxo a ECM produzida por HUVECs, apenas ALT-C 1.000nM inibiu de forma significativa a adesão das células tumorais de mama. Tal efeito pode ser devido à mistura de diferentes componentes da matriz produzida, conforme citado anteriormente. Provavelmente, assim, como nos estudos de inibição estática, as interações de ALT-C com as células tumorais se deram através da $\alpha 2\beta 1$ expressa por essa linhagem.

Nos ensaios em condições estáticas descritos anteriormente, ALT-C foi capaz de inibir a adesão de MDA-MB-231 ao colágeno I e a ECM produzida por HUVECs, em concentrações de 1-10 μ M e 10 μ M, respectivamente. Estudos mostraram que o fluxo ativa a integrina $\alpha 2\beta 1$, entre outras (ORR et al., 2006) em células endoteliais pelas forças de cisalhamento, aumentando a adesão de MDA-MB-231 a ECM produzida por HUVECs sob fluxo comparada com ECM estática (GOMES et al., 2005). Assim, é possível que $\alpha 2\beta 1$ tenha sido ativada nas células tumorais de modo a reforçar os efeitos de ALT-C na interação com a integrina, permitindo efeitos eficazes a ponto de ter ocorrido inibição por ALT-C em concentrações 100 e 10

vezes menores do que nos ensaios estáticos sobre colágeno I e ECM, respectivamente.

O local de metástase das células tumorais é influenciado pela composição da ECM e pelas integrinas expressas pelas células tumorais (PIGNATELLI & STAMP, 1995). O osso é um dos sítios mais comuns de metástase em câncer de mama, próstata, pulmão e tireóide, entre outros (YONEDA et al., 2001; MUNDY, 2002). A matriz óssea é constituída principalmente por colágeno I (CARTER & SPENGLER, 1978), havendo também fibronectina e colágeno IV.

Estudos mostraram que as integrinas $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 3\beta 1$ estão envolvidas no processo de adesão de células tumorais de mama a matriz óssea (LUNDSTROM et al., 1998). As células malignas de câncer de mama, assim como outras células tumorais, devem ser capazes de interagir com a densa matriz colagenosa que circunda os tumores. Soma-se a isto, ainda, que o colágeno tipo I está entre os principais colágenos fibrilares detectados nos vasos, representando cerca de 60% dos colágenos vasculares, com os quais as células em extravasamento devem entrar em contato (MAYNE, 1986; PROCKOP & KIVIRIKKO, 1995). Portanto, as interações das células tumorais de mama com esta proteína componente da ECM são cruciais para a progressão desse tipo de tumor.

Altas taxas de expressão de $\beta 1$ foram associadas com diminuição significativa da sobrevivência de pacientes com câncer de mama, estando envolvidas na resistência a quimioterapia e a radioterapia no câncer de mama e também em malignidades hematológicas e no pulmão (DAMIANO & DALTON, 2000; AOUDJIT & VUORI, 2001; DAMIANO et al., 2001; CORDES et al., 2006), comprovando seu papel potencial como alvo terapêutico e fator preditivo. Estudos recentes mostraram que inibição de integrinas contendo a subunidade $\beta 1$ através de anticorpos

específicos aumenta seletivamente a apoptose e diminui a proliferação de câncer de mama em culturas tridimensionais, sem efeitos tóxicos *in vivo* para o hospedeiro (PARK et al., 2006).

Diante da importância do colágeno e das integrinas $\beta 1$ na progressão tumoral, entre outras situações patológicas, ALT-C mostra-se uma importante molécula para o estudo de processos adesivos por sua capacidade de interação com a integrina $\alpha 2\beta 1$, como aqueles envolvidos nas interações entre células tumorais e ECM durante o extravasamento e durante a colonização metastática.

DisBa-01 também foi capaz de inibir a adesão das células MDA-MB-231 ao colágeno I sob condições de fluxo nas duas concentrações testadas, 100 e 1.000nM, sendo o efeito mais pronunciado em 100nM.

Como DisBa-01 tem mostrado especificidade para a integrina $\beta 3$ seus efeitos inibitórios ao colágeno sob fluxo poderiam ser explicados por sua interação com duas integrinas. Uma delas seria $\alpha V\beta 3$, presente nas células tumorais utilizadas. Embora seu principal ligante seja a vitronectina e não o colágeno, estudos mostraram que $\alpha V\beta 3$ é capaz de interagir com matrizes de colágeno (GOTWALS et al., 1996; RACINE-SAMSON et al., 1997; COOKE et al., 2000; GRUNDSTROM et al., 2003), dependendo do tipo celular.

Entretanto, os efeitos inibitórios não foram observados em condições estáticas. (GOMES et al., 2005) mostraram que um antagonista não-peptídico para a integrina $\alpha V\beta 3$ inibiu adesão tumoral sob fluxo, mas não em condições estáticas, assim como foi observado para DisBa-01. O fluxo também é capaz de ativar a integrinas $\alpha V\beta 3$ (PAMPORI et al., 1999), além de $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$ (ORR et al., 2006) em células endoteliais pelas forças de cisalhamento, aumentando a adesão de MDA-MB-231 a ECM produzida por HUVECs (GOMES et al., 2005). Portanto, é

possível que $\alpha V\beta 3$ tenha sido ativada nas células tumorais reforçando os efeitos de DisBa-01 na interação com essa integrina, possibilitando o efeito inibitório na adesão, o que não observado sob condições estáticas.

A adesão das células tumorais ao subendotélio é mediada principalmente por integrinas e reforçada por interações com plaquetas (HONN & TANG, 1992). As plaquetas estão envolvidas na progressão tumoral e podem facilitar a formação de metástases pelo reforço na adesão de células tumorais a ECM subendotelial sob condições de fluxo (BASTIDA et al., 1989; DARDIK et al., 1997). Alguns estudos sugerem que os agregados plaquetários protegem as células tumorais da atividade citotóxica de agentes naturais como células *killer* (HONN et al., 1992; NIESWANDT et al., 1999).

Uma cooperação entre $\alpha IIb\beta 3$ plaquetária e $\alpha V\beta 3$ tumoral ocorre para promover a adesão a matriz subendotelial sob fluxo (GOMES et al., 2004). Assim, devido a sua capacidade de inibir a agregação plaquetária através da ligação à integrina $\alpha IIb\beta 3$ (KAUSKOT et al., 2008), é possível que DisBa-01 tenha inibido a adesão das células tumorais por interagir com as mesmas diretamente e/ou por sua capacidade de inibir a formação de agregados plaquetários.

Antagonistas de $\alpha IIb\beta 3$ plaquetária e $\alpha V\beta 3$ tumoral inibem parcialmente a adesão de células tumorais ao subendotélio, sugerindo que tal interação provavelmente envolve diversos tipos de receptores na célula tumoral e também uma cooperação entre integrinas de diferentes células (tumorais e plaquetárias) (GOMES et al., 2004). Assim, uma combinação de vários antagonistas de integrinas deve bloquear de maneira eficiente o processo de extravasamento, um dos eventos mais importantes na progressão metastática.

O local de metástase das células tumorais é influenciado pela composição da ECM e pelas integrinas expressas pelas células tumorais (PIGNATELLI & STAMP, 1995). O osso é um dos sítios mais comuns de metástase em câncer de mama, próstata, pulmão e tireóide, entre outros (YONEDA et al., 2001; MUNDY, 2002). Células de carcinoma de mama na matriz óssea apresentam altos níveis de $\alpha V\beta 3$ quando comparadas com o carcinoma primário (LIAPIS et al., 1996) e a expressão dessa integrina está diretamente associada com a habilidade aumentada dessas células de promover metástases ósseas (PECHEUR et al., 2002). Deste modo, as interações entre células tumorais de mama e a ECM mediadas por $\alpha V\beta 3$, assim como aquelas mediadas por $\alpha 2\beta 1$, são de grande importância para a progressão deste tipo de tumor.

Diante dos resultados apresentados e da capacidade de interação com a integrina $\alpha V\beta 3$ e de inibição de angiogênese e metástase *in vivo* (RAMOS et al., 2008) DisBa-01 mostra-se uma molécula promissora nos estudos envolvendo processos metastáticos como extravasamento e a própria formação da metástase, e potencial candidata ao desenvolvimento de terapias anti-câncer.

5.1.2. Células de melanoma murino B16F10

Ensaio de adesão (promoção, inibição e desadesão) foram realizados com uma outra linhagem tumoral, a B16F10 de melanoma murino, para testar a especificidade dos efeitos causados pelas duas desintegrinas. A linhagem foi escolhida devido a estudos prévios com DisBa-01 mostrarem que ela exerce efeitos na adesão e na metástase deste tipo celular.

Inicialmente foram realizados ensaios de promoção da adesão testando as desintegrinas e alguns componentes da ECM, como colágenos tipos I, III e IV,

fibronectina e vitronectina. Todas as proteínas testadas (desintegrinas e ECM) promoveram fortemente a adesão das células de melanoma.

Estudos mostraram que as células B16F10 apresentam altos níveis das subunidades $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\beta 1$, expressando também $\alpha 5$ e $\alpha 6$, mas não $\alpha 2$ e $\alpha 3$. A integrina $\alpha V\beta 3$ também é altamente expressa nestas células (RAY et al., 1999).

Sabe-se que conjunto das integrinas expressas em cada tipo celular determina a ligação e a afinidade das integrinas aos ligantes. Além disso, a função das integrinas pode variar entre os diferentes tipos celulares. Células expressando todas as integrinas ligantes de colágeno exceto $\alpha 2\beta 1$ podem se aderir a colágenos fibrilares. Assim, além da integrina $\alpha 2\beta 1$, uma combinação de outros receptores para colágeno são capazes de mediar a adesão a essa proteína (TULLA et al., 2001; ZHANG et al., 2003).

Diante de tais dados, embora ALT-C tenha se mostrado específica para a integrina $\alpha 2\beta 1$ (SOUZA et al., 2000), é possível que tenha sustentado a adesão celular através da interação com outra integrina, como a $\alpha 1\beta 1$, receptor para colágeno detectado nestas células.

DisBa-01, por sua vez, provavelmente promoveu a adesão através da interação com a integrina $\alpha V\beta 3$, com a qual tem mostrado forte ligação.

A adesão aos colágenos provavelmente se deu através de $\alpha 1\beta 1$, único receptor para essas proteínas da ECM pertencente ao grupo principal de integrinas para o colágeno. Embora esta integrina interaja preferencialmente com o colágeno IV, ela reconhece e se liga a colágenos fibrilares como os tipos I e III, conforme já citado.

A adesão das células de melanoma a fibronectina e a vitronectina provavelmente ocorreu através das integrinas $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha V\beta 3$, respectivamente. De

fato, estudos mostraram que o bloqueio da subunidade $\alpha 5$ impediu a adesão a fibronectina nas células B16F10 (QIAN et al., 2005).

Os ensaios dos experimentos de inibição da adesão de B16F10 foram realizados com os colágenos tipos I e III. ALT-C inibiu a adesão celular aos dois tipos de colágeno de maneira bastante semelhante. Entretanto, como foi reportado que estas células de melanoma não possuem $\alpha 2\beta 1$, ALT-C possivelmente interagiu com outra integrina, como a $\alpha 1\beta 1$, da mesma forma que foi sugerido para a adesão aos colágenos. Conforme já citado, a adesão depende não apenas da especificidade entre ligante e receptor, mas também do conjunto de integrinas presentes na superfície celular. O fato de ALT-C ter inibido a adesão de B16F10 aos colágenos a partir em concentração superior (2,5 vezes) a observada para as células tumorais de mama MDA-MB-231, as quais expressam $\alpha 2\beta 1$, pode sugerir uma afinidade maior por essa integrina quando ela está presente na superfície celular.

Assim como observado para a linhagem tumoral de mama MDA-MB-231, DisBa-01 não foi capaz de inibir a adesão aos colágenos I e III. DisBa-01 foi capaz de inibir a adesão de B16F10, entretanto, o substrato adesivo utilizado foi a vitronectina, ligante da integrina $\alpha V\beta 3$, com a qual DisBa-01 interage (RAMOS et al., 2008).

Células B16F10 ligadas aos colágenos tipos I ou III e posteriormente incubadas com ALT-C permaneceram aderidas, enquanto DisBa-01 foi capaz de desaderir as células aderidas ao colágeno I.

DisBa-01 sendo específica para as integrinas $\beta 3$ e supondo que ela não seja capaz de interagir com a integrina $\alpha 1\beta 1$ possivelmente ativou um mecanismo de trans-dominância (DIAZ-GONZALEZ et al., 1996) entre as integrinas $\alpha V\beta 3$ e $\alpha 1\beta 1$, com a primeira inibindo a adesão da segunda ao colágeno.

Ramos et al. (2008) demonstraram que DisBa-01 inibiu a proliferação das células de melanoma aderidas à vitronectina, porém, não foram detectados efeitos citotóxicos da desintegrina em B16F10. Portanto, embora DisBa-01 tenha ocasionado a desadesão das células de melanoma, além dos efeitos verificados anteriormente por outros estudos, a desintegrina interrompe as funções adesivas mas sem efeitos diretos na sobrevivência celular.

Os resultados obtidos para as células B16F10 apresentados nesta tese confirmam que Disba-01 apresenta especificidade para ligações a vitronectina, de forma que suas interações são mais fortes com tais células do que para as MDA-MB-231, conforme já mostrado em estudos anteriores analisando os efeitos da DisBa-01 na adesão, proliferação e metástase (KAUSKOT et al., 2008). ALT-C, embora apresentando efeitos em alguns ensaios com a B16F10, mostrou que interage fortemente com as MDA-MB-231, ao contrário de DisBa-01. Assim, cada desintegrina mostra melhor interação com um tipo celular específico, o qual apresenta seu conjunto diferenciado de integrinas.

5.1.3. Fibroblastos humanos

Além de testar os efeitos de ALT-C e DisBa-01 na adesão e viabilidade de células tumorais, os efeitos das desintegrinas foram verificados também para a linhagem não tumoral de fibroblastos humanos.

Inicialmente, os fibroblastos foram adicionados a ALT-C e DisBa-01 imobilizadas para verificar a adesão sobre essas proteínas. Além das desintegrinas, diferentes proteínas da ECM foram utilizadas (colágenos I, III e IV, e fibronectina) para verificar a adesão dos fibroblastos para cada uma delas.

Os fibroblastos aderiram a todos os substratos testados, sendo que a adesão ocorreu mais fortemente aos colágenos, ALT-C na maior concentração e DisBa-01 em todas as concentrações utilizadas.

As análises por citometria mostraram que a linhagem utilizada não apresenta a integrina $\alpha 2\beta 1$, principal receptor para os colágenos fibrilares. Entretanto, os fibroblastos aderem ao colágeno através das integrinas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 3\beta 1$ (ZHU et al., 2009). A subunidade $\alpha 1$ não foi analisada, mas a $\alpha 3$ foi detectada nestas células. Deste modo, a adesão ao colágeno pode ter ocorrido pelas integrinas $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 1\beta 1$, caso esta também seja expressa na linhagem. Da mesma forma, ALT-C pode ter promovido a adesão através de uma dessas duas integrinas.

A adesão a fibronectina e à DisBa-01 deve ter ocorrido através das integrinas $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha V\beta 3$ (ambas detectadas por citometria), respectivamente, conforme já descrito (ZHU et al., 2009). Os fibroblastos podem ter se ligado a fibronectina também pela integrina $\alpha V\beta 1$, outro receptor para fibronectina cujas subunidades também foram detectadas nessas células.

Após verificar que ALT-C e DisBa-01 interagem como moléculas de adesão para os fibroblastos humanos, foram realizados ensaios de inibição da adesão dessas células ao colágeno tipo I, proteína da ECM com a qual interagiram mais fortemente.

ALT-C inibiu a adesão dos fibroblastos ao colágeno na maior concentração testada (10.000nM). DisBa-01, por sua vez, não apresentou efeitos sobre a adesão ao colágeno, devido, provavelmente, ao fato de interagir com integrina $\alpha V\beta 3$, receptoras para a vitronectina.

Os fibroblastos possuem papel importante na manutenção tecidual, de forma que sua anoikis seria prejudicial para o funcionamento dos organismos, ao contrário da perda de ancoragem de células tumorais. Com o intuito de investigar possíveis efeitos apoptóticos das desintegrinas nestas células, foram feitos ensaios de adesão e viabilidade celular.

As células aderidas ao colágeno I e posteriormente tratadas com uma das desintegrinas mantiveram a adesão. Ensaio de viabilidade dos fibroblastos mostraram que ALT-C induziu um aumento em relação ao controle, que aumentou com o decorrer dos períodos de incubação, ou seja, foi dependente do tempo. DisBa-01 não apresentou efeitos sobre a proliferação de células desta linhagem. Dessa forma, nenhuma das desintegrinas causa anoikis de fibroblastos.

É importante salientar que os fibroblastos utilizados são células essenciais para a manutenção dos tecidos por serem responsáveis pela produção e organização da ECM, além de produzir fatores de crescimento como o VEGF.

Uma área de pesquisa que vem crescendo é a engenharia tecidual, caracterizada pelo desenvolvimento e manipulação de moléculas, células, tecidos ou órgãos para o restabelecimento da estrutura e função de partes do corpo danificadas ou defeituosas. Atualmente, os avanços tecnológicos têm permitido que haja uma regeneração adequada (ASSAEL, 2003), compreendendo tecidos como o cartilaginoso, ósseo, cardiovascular e pele.

Para que o tecido danificado possa ser reparado e/ou substituído é necessária uma matriz (constituída de colágeno ou polímeros sintéticos) que fornecerá sustentação para as células necessárias para o remodelamento/regeneração, entre elas os fibroblastos, além da adição de moléculas solúveis, como fatores de crescimento (Ueda et al., 2000). As vantagens

deste tipo de reparo é que ele não causa resposta imunológica e não mutila outras regiões do paciente.

Os efeitos observados para ALT-C em relação à promoção da adesão e à indução da proliferação dos fibroblastos, somados ao fato dessa desintegrina-*like* disparar sinalização de sobrevivência nessas células (COMINETTI et al., 2004) e modular a angiogênese de forma a induzir a neovascularização, fazem dessa proteína uma molécula promissora em áreas como o remodelamento tecidual.

5.2. EXPRESSÃO GÊNICA DE VEGF E VEGFR EM FIBROBLASTOS E EM CÉLULAS ENDOTELIAIS

Se por um lado a adesão célula-ECM é importante para a manutenção da arquitetura tecidual, por outro, a própria manutenção depende do suprimento de oxigênio e de nutrientes para a sobrevivência celular. O limite de difusão do oxigênio é de 100-200mm, portanto, quando a distância entre os tecidos e os vasos sanguíneos aumenta, novos vasos devem ser recrutados por vasculogênese e angiogênese.

Conforme citado anteriormente, a neovascularização é regulada pelo balanço entre moléculas pró e anti-angiogênicas, cuja proporção encontra-se modificada em determinadas situações patológicas levando a angiogênese anormal.

Estudos anteriores mostraram que ALT-C, bem como DisBa-01, são capazes de interagir com células tumorais, mas também com células endoteliais. ALT-C incubada em sua forma solúvel com fibroblastos humanos é capaz de induzir a expressão de diversos genes relacionados à proliferação e à sinalização celular, dentre eles o VEGF. Além disto, a desintegrina-*like* é capaz de promover a proliferação de HUVECs (COMINETTI et al., 2004) e de modular a angiogênese

(RAMOS et al., 2008). Concentrações entre 10-100nM de ALT-C estimularam a migração de células endoteliais *in vitro* e a angiogênese *in vivo*, enquanto concentrações mais elevadas (1000nM) inibiram a proliferação, a migração e a angiogênese (RAMOS et al., 2007). DisBa-01, por sua vez, inibe a adesão e a proliferação de células endoteliais, e também a migração dessas células e a angiogênese *in vivo* (KAUSKOT et al., 2008).

Assim, baseando-se em estudos anteriores sobre ALT-C e DisBa-01 envolvendo processos angiogênicos, resolveu-se investigar os efeitos das duas desintegrinas na expressão do VEGF e dos seus receptores, VEGFR-1 e VEGFR-2. Devido ao fato de os fibroblastos serem um dos responsáveis pela expressão do VEGF e este interagir com os receptores expressos na superfície de células endoteliais, a expressão de VEGF foi avaliada nos fibroblastos, enquanto seus receptores foram analisados nas células endoteliais HUVEC e HMEC-1. Um peptídeo sintético com seqüência baseada no motivo adesivo da ALT-C, ALT-C PEP, também foi testado em células HUVEC.

5.2.1. Fibroblastos humanos

As análises dos níveis de mRNA para o VEGF mostraram que ALT-C foi capaz de modular a expressão desse fator de crescimento. A desintegrina-*like* na concentração de apenas 1nM de capaz de duplicar o nível de mRNA para o VEGF após 48 horas de incubação. Tal efeito poderia explicar a indução da angiogênese sob baixas concentrações de ALT-C (COMINETTI et al., 2004; RAMOS et al., 2007). Em contraste, um período mais longo de incubação, 72 horas, ALT-C 10nM diminuiu a expressão do fator de crescimento.

DisBa-01 também foi capaz de aumentar a expressão do VEGF, entretanto o efeito foi verificado sob a maior concentração, 1.000nM. 100nM da proteína diminuíram a expressão do fator de crescimento. Assim como ALT-C, DisBa-01 diminuiu a expressão do VEGF em 72 horas.

5.2.2. Células endoteliais HUVEC

Os dois receptores para o VEGF apresentaram modificações em sua expressão nas células tratadas com ALT-C. ALT-C 1nM aumentou a expressão do VEGFR-1, a qual não foi mantida, decrescendo. A expressão do VEGFR-2 nas células incubadas com ALT-C 1nM, entretanto, é mantida superior a do controle.

O VEGFR-1 o receptor que controla negativamente a angiogênese e o VEGFR-2 é responsável pela sinalização que resulta na formação de novos vasos. A expressão do VEGFR-1 decresceu com o tempo e a do segundo foi superior a do controle em todos os períodos de incubação. Contrariamente, o VEGFR-1 teve sua expressão aumentada sob a maior concentração de ALT-C, enquanto o VEGFR-2 teve seu nível diminuído nas células tratadas com a mesma concentração. Tais resultados podem explicar os efeitos da ALT-C observados na angiogênese *in vivo*, nos quais concentrações menores da proteína induzem a formação de vasos (RAMOS et al., 2007), enquanto concentrações maiores inibem o processo, concordando também com a proliferação (COMINETTI et al., 2004) e a migração endotelial (RAMOS et al., 2007).

Um peptídeo sintético baseado na sequência da ALT-C, denominado ALT-C PEP, também foi testado na expressão dos receptores para o VEGF em células HUVECs. ALT-C PEP sintético teve efeito significativo na expressão de ambos os receptores apenas na concentração de 100nM, quando duplicou o nível dos

VEGFRs em relação ao controle. Nesta concentração ALT-C PEP não teve efeito na proliferação de HUVECs e na formação de vasos *in vivo* (RAMOS et al., 2007). É possível, portanto, que a indução similar da expressão dos VEGFRs leve a uma neutralização da ação de ambos em 100nM. ALT-C PEP foi capaz de induzir a proliferação de HUVECs e também a angiogênese apenas em 10nM, mas a formação de vasos ocorreu de forma mais fraca que a observada com ALT-C, aproximadamente metade do efeito em relação a desintegrina. Assim, ALT-C PEP parece induzir a sinalização de forma menos prolongada.

Em altas concentrações o peptídeo inibiu a proliferação endotelial (500nM) e a angiogênese (1000nM) (RAMOS et al., 2007). ALT-C PEP em 1nM não teve efeito na proliferação, condição não testada na neovascularização. Desta forma, os mecanismos que levam aos efeitos observados para ALT-C PEP aguardam estudos mais detalhados, incluindo experimentos com maior número de concentração e períodos de incubação.

Os resultados apresentados para a expressão de VEGFRs em HUVECs tratadas com ALT-C e ALT-C PEP, bem como o efeito de ambos na migração dessas células e na angiogênese *in vivo*, e a ação de ALT-C PEP na proliferação endotelial foram recentemente publicados em “Modulation of *in vitro* and *in vivo* angiogenesis by alternagin-C, a disintegrin-like protein from *Bothrops alternatus* snake venom and by a peptide derived from its sequence”, em Ramos *et al.*, 2007.

DisBa-01 alterou apenas a expressão do VEGFR-1 em HUVECs. A alteração ocorreu somente na maior concentração, 100nM e após 24 horas, quando a desintegrina duplicou os níveis do mRNA para o receptor. Considerando-se que o VEGFR-1, como dito anteriormente, é um regulador negativo da angiogênese, o fato

de estar aumentado enquanto o VEGFR-2 não sofreu alterações pode explicar, ao menos em parte, a inibição da angiogênese pela DisBa-01 (RAMOS et al., 2008).

5.2.3. Células endoteliais HMEC-1

O tratamento das células HMEC-1 com ALT-C não causou efeitos na expressão do VEGFR-1. O VEGFR-2, por outro lado, teve sua expressão aumentada nas células incubadas com ALT-C 100nM em 4 e 48 horas. O efeito mais forte, porém, foi observado para as células tratadas com ALT-C 1, com aumento de aproximadamente 9 vezes em relação ao controle. Da mesma forma que o observado nas HUVECs, a menor dose de ALT-C aumentando o VEGFR-2 mas não o VEGFR-1 confirma os efeitos da desintegrina-*like* na indução de processos angiogênicos.

DisBa-01 induziu uma forte diminuição na expressão de ambos os receptores em HMEC-1 em todas as condições testadas, exceto em 1nM, após 4 horas, quando não apresentou efeito na expressão. Tais resultados estão em concordância com a ação inibidora desta desintegrina sobre a proliferação de HMEC-1 e sobre a angiogênese *in vivo* (RAMOS et al., 2008).

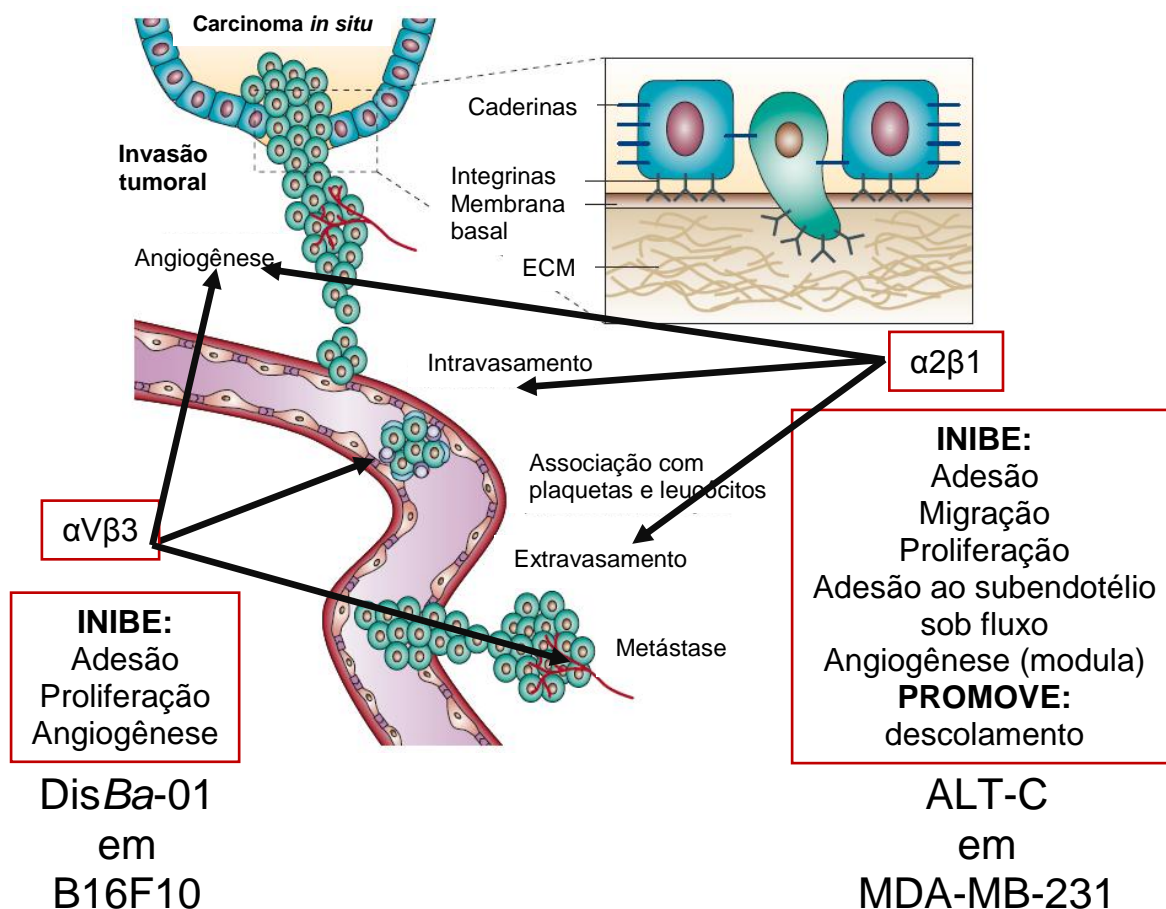
Tais resultados apresentados para ALT-C e DisBa-01 relacionados a angiogênese, somados àqueles obtidos em outros estudos sugerem essas desintegrinas como potenciais candidatas a moléculas modelo para o desenvolvimento de drogas tanto para tratamentos pró-angiogênicos (ALT-C), como em terapias em que se deseja inibir a neovascularização (DisBa-01 e ALT-C).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos para ALT-C e DisBa-01 apresentados nesta tese confirmam que essas proteínas apresentam especificidades em relação aos seus efeitos na adesão e viabilidade celular, bem como aos processos envolvidos na angiogênese, como a modulação de VEGF e seus receptores.

De maneira geral, o uso do modelo de estudo tumoral usando as células de tumor mamário MDA-MB-231 teve maior sucesso com ALT-C, embora DisBa-01 tenha inibido a adesão dessas células sob fluxo. Da mesma maneira, DisBa-01 tem apresentado sucesso no modelo tumoral com as células de melanoma murino B16F10, embora ALT-C tenha apresentado efeito em alguns ensaios.

As ações de ALT-C e DisBa-01 nos processos envolvidos na progressão metastática podem ser representados na figura abaixo:



Representação dos efeitos de ALT-C e DisBa-01 na progressão tumoral.

Figura modificada (GUO & GIANCOTTI, 2004).

Portanto, os efeitos aqui apresentados relativos às células tumorais e a processos angiogênicos contribuem para a compreensão dos mecanismos pelos quais ALT-C e DisBa-01 agem nas células. Além disto, tais resultados somados aos obtidos em estudos anteriores fazem destas desintegrinas moléculas promissoras nos estudos envolvendo processos metastáticos e angiogênicos, tornando-as potenciais candidatas ao desenvolvimento de terapias envolvendo metástase e angiogênese.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, M.; LAZARUS, R.A.; DENNIS, M.S., et al. Solution structure of kistrin, a potent platelet aggregation inhibitor and GP IIb-IIIa antagonist. **Science**, v.253 (5018), p.445-8, 1991.
- AKALU, A.; CRETU, A.; BROOKS, P.C. Targeting integrins for the control of tumour angiogenesis. **Expert Opin Investig Drugs**, v.14 (12), p.1475-86, 2005.
- AKIYAMA, S.K.; OLDEN, K.; YAMADA, K.M. Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v.14 (3), p.173-89, 1995.
- AKIYAMA, S.K.; YAMADA, S.S.; YAMADA, K.M., et al. Transmembrane signal transduction by integrin cytoplasmic domains expressed in single-subunit chimeras. **J Biol Chem**, v.269 (23), p.15961-4, 1994.
- ALBELDA, S.M. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. **Lab Invest**, v.68 (1), p.4-17, 1993.
- ALBELDA, S.M.; METTE, S.A.; ELDER, D.E., et al. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. **Cancer Res**, v.50 (20), p.6757-64, 1990.
- ALON, T.; HEMO, I.; ITIN, A., et al. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. **Nat Med**, v.1 (10), p.1024-8, 1995.
- ANDRE, P.; PRASAD, K.S.; DENIS, C.V., et al. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. **Nat Med**, v.8 (3), p.247-52, 2002.
- AOUDJIT, F.; VUORI, K. Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. **Oncogene**, v.20 (36), p.4995-5004, 2001.
- APLIN, A.E.; HOWE, A.; ALAHARI, S.K., et al. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. **Pharmacol Rev**, v.50 (2), p.197-263, 1998.
- ARNAOUT, M.A.; MAHALINGAM, B.; XIONG, J.P. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.21 p.381-410, 2005.
- ARORA, N.; MASOOD, R.; ZHENG, T., et al. Vascular endothelial growth factor chimeric toxin is highly active against endothelial cells. **Cancer Res**, v.59 (1), p.183-8, 1999.
- ASAHARA, T.; BAUTERS, C.; PASTORE, C., et al. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. **Circulation**, v.91 (11), p.2793-801, 1995.

ASAHARA, T.; MASUDA, H.; TAKAHASHI, T., et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. **Circ Res**, v.85 (3), p.221-8, 1999.

ASSAEL, L.A. The promise of tissue engineering. **J Oral Maxillofac Surg**, v.61 (2), p.155-6, 2003.

ASSOIAN, R.K.; SCHWARTZ, M.A. Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression. **Curr Opin Genet Dev**, v.11 (1), p.48-53, 2001.

AUERBACH, R. Patterns of tumor metastasis: organ selectivity in the spread of cancer cells. **Lab Invest**, v.58 (4), p.361-4, 1988.

AUTIERO, M.; WALTENBERGER, J.; COMMUNI, D., et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. **Nat Med**, v.9 (7), p.936-43, 2003.

BALDWIN, M.E.; STACKER, S.A.; ACHEN, M.G. Molecular control of lymphangiogenesis. **Bioessays**, v.24 (11), p.1030-40, 2002.

BANAI, S.; JAKLITSCH, M.T.; SHOU, M., et al. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. **Circulation**, v.89 (5), p.2183-9, 1994.

BARCELLOS-HOFF, M.H.; PARK, C.; WRIGHT, E.G. Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy. **Nat Rev Cancer**, v.5 (11), p.867-75, 2005.

BARTSCH, J.E.; STAREN, E.D.; APPERT, H.E. Adhesion and migration of extracellular matrix-stimulated breast cancer. **J Surg Res**, v.110 (1), p.287-94, 2003.

BASTIDA, E.; ALMIRALL, L.; ORDINAS, A. Platelet and shear rate promote tumor cell adhesion to human endothelial extracellular matrix--absence of a role for platelet cyclooxygenase. **Thromb Haemost**, v.61 (3), p.485-9, 1989.

BAUER, J.S.; VARNER, J.; SCHREINER, C., et al. Functional role of the cytoplasmic domain of the integrin alpha 5 subunit. **J Cell Biol**, v.122 (1), p.209-21, 1993.

BAZAN-SOCHA, S.; KISIEL, D.G.; YOUNG, B., et al. Structural requirements of MLD-containing disintegrins for functional interaction with alpha 4 beta 1 and alpha 9 beta 1 integrins. **Biochemistry**, v.43 (6), p.1639-47, 2004.

BERRIER, A.L.; YAMADA, K.M. Cell-matrix adhesion. **J Cell Physiol**, v.213 (3), p.565-73, 2007.

BEVIGLIA, L.; STEWART, G.J.; NIEWIAROWSKI, S. Effect of four disintegrins on the adhesive and metastatic properties of B16F10 melanoma cells in a murine model. **Oncol Res**, v.7 (1), p.7-20, 1995.

BIKFALVI, A.; BICKNELL, R. Recent advances in angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting. **Trends Pharmacol Sci**, v.23 (12), p.576-82, 2002.

BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol Ther**, v.62 (3), p.325-72, 1994.

BJARNASON, J.B.; TU, A.T. Hemorrhagic toxins from Western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin e. **Biochemistry**, v.17 (16), p.3395-404, 1978.

BLACK, R.A.; WHITE, J.M. ADAMs: focus on the protease domain. **Curr Opin Cell Biol**, v.10 (5), p.654-9, 1998.

BLOBEL, C.P.; WOLFSBERG, T.G.; TURCK, C.W., et al. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. **Nature**, v.356 (6366), p.248-52, 1992.

BLOOD, C.H.; ZETTER, B.R. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. **Biochim Biophys Acta**, v.1032 (1), p.89-118, 1990.

BONNEFOY, A.; HARSFALVI, J.; PFLIEGLER, G., et al. The subendothelium of the HMEC-1 cell line supports thrombus formation in the absence of von Willebrand factor and collagen types I, III and VI. **Thromb Haemost**, v.85 (3), p.552-9, 2001.

BORGSTROM, P.; GOLD, D.P.; HILLAN, K.J., et al. Importance of VEGF for breast cancer angiogenesis in vivo: implications from intravital microscopy of combination treatments with an anti-VEGF neutralizing monoclonal antibody and doxorubicin. **Anticancer Res**, v.19 (5B), p.4203-14, 1999.

BRAKEBUSCH, C.; FASSLER, R. The integrin-actin connection, an eternal love affair. **EMBO J**, v.22 (10), p.2324-33, 2003.

BROOKS, P.C.; CLARK, R.A.; CHERESH, D.A. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. **Science**, v.264 (5158), p.569-71, 1994.

BROOKS, P.C.; MONTGOMERY, A.M.; ROSENFELD, M., et al. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. **Cell**, v.79 (7), p.1157-64, 1994.

BROOKS, P.C.; STROMBLAD, S.; KLEMKE, R., et al. Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. **J Clin Invest**, v.96 (4), p.1815-22, 1995.

BRUMMENDORF, T.; RATHJEN, F.G. Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. **Protein Profile**, v.2 (9), p.963-1108, 1995.

BUTLER, T.P.; GULLINO, P.M. Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. **Cancer Res**, v.35 (3), p.512-6, 1975.

BYZOVA, T.V.; GOLDMAN, C.K.; PAMPORI, N., et al. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. **Mol Cell**, v.6 (4), p.851-60, 2000.

CALDERWOOD, D.A.; TUCKWELL, D.S.; EBLE, J., et al. The integrin alpha1 A-domain is a ligand binding site for collagens and laminin. **J Biol Chem**, v.272 (19), p.12311-7, 1997.

CALDERWOOD, D.A.; TUCKWELL, D.S.; HUMPHRIES, M.J. Specificity of integrin I-domain-ligand binding. **Biochem Soc Trans**, v.23 (4), p.504S, 1995.

CALVETE, J.J. Structure-function correlations of snake venom disintegrins. **Curr Pharm Des**, v.11 (7), p.829-35, 2005.

CALVETE, J.J.; FOX, J.W.; AGELAN, A., et al. The presence of the WGD motif in CC8 heterodimeric disintegrin increases its inhibitory effect on alphaII(b)beta3, alpha(v)beta3, and alpha5beta1 integrins. **Biochemistry**, v.41 (6), p.2014-21, 2002.

CALVETE, J.J.; JURGENS, M.; MARCINKIEWICZ, C., et al. Disulphide-bond pattern and molecular modelling of the dimeric disintegrin EMF-10, a potent and selective integrin alpha5beta1 antagonist from *Eristocophis macmahoni* venom. **Biochem J**, v.345 Pt 3 p.573-81, 2000.

CALVETE, J.J.; MARCINKIEWICZ, C.; MONLEON, D., et al. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v.45 (8), p.1063-74, 2005.

CALVETE, J.J.; MORENO-MURCIANO, M.P.; SANZ, L., et al. The disulfide bond pattern of catrocollastatin C, a disintegrin-like/cysteine-rich protein isolated from *Crotalus atrox* venom. **Protein Sci**, v.9 (7), p.1365-73, 2000.

CALVETE, J.J.; MORENO-MURCIANO, M.P.; THEAKSTON, R.D., et al. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. **Biochem J**, v.372 (Pt 3), p.725-34, 2003.

CALVETE, J.J.; SCHAFER, W.; SOSZKA, T., et al. Identification of the disulfide bond pattern in albolabrin, an RGD-containing peptide from the venom of *Trimeresurus albolabris*: significance for the expression of platelet aggregation inhibitory activity. **Biochemistry**, v.30 (21), p.5225-9, 1991.

CALVETE, J.J.; SCHRADER, M.; RAIDA, M., et al. The disulphide bond pattern of bitistatin, a disintegrin isolated from the venom of the viper *Bitis arietans*. **FEBS Lett**, v.416 (2), p.197-202, 1997.

CALVETE, J.J.; WANG, Y.; MANN, K., et al. The disulfide bridge pattern of snake venom disintegrins, flavoridin and echistatin. **FEBS Lett**, v.309 (3), p.316-20, 1992.

CAMPER, L.; HELLMAN, U.; LUNDGREN-AKERLUND, E. Isolation, cloning, and sequence analysis of the integrin subunit alpha10, a beta1-associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes. **J Biol Chem**, v.273 (32), p.20383-9, 1998.

CARLOS, T.M.; HARLAN, J.M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**, v.84 (7), p.2068-101, 1994.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nat Med**, v.9 (6), p.653-60, 2003.

CARMELIET, P.; FERREIRA, V.; BREIER, G., et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. **Nature**, v.380 (6573), p.435-9, 1996.

CARMELIET, P.; MOONS, L.; LUTTUN, A., et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. **Nat Med**, v.7 (5), p.575-83, 2001.

CARTER, D.R.; SPENGLER, D.M. Mechanical properties and composition of cortical bone. **Clin Orthop Relat Res**, (135), p.192-217, 1978.

CHANDRASEKARAN, L.; HE, C.Z.; AL-BARAZI, H., et al. Cell contact-dependent activation of alpha3beta1 integrin modulates endothelial cell responses to thrombospondin-1. **Mol Biol Cell**, v.11 (9), p.2885-900, 2000.

CHANDRASEKARAN, S.; GUO, N.H.; RODRIGUES, R.G., et al. Pro-adhesive and chemotactic activities of thrombospondin-1 for breast carcinoma cells are mediated by alpha3beta1 integrin and regulated by insulin-like growth factor-1 and CD98. **J Biol Chem**, v.274 (16), p.11408-16, 1999.

CHEN, T.; RAEL, E.D. Purification of M5, a fibrinolytic proteinase from *Crotalus molossus molossus* venom that attacks complement. **Int J Biochem Cell Biol**, v.29 (5), p.789-99, 1997.

CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v.29 (11), p.1279-303, 1991.

CHUANG, W.J.; WU, C.H.; HUANG, H.N., et al. Comparison of the binding character of triflavin on resting and activated alpha(IIb)beta(3) integrin in human platelets by electron microscopy. **Thromb Res**, v.109 (1), p.37-46, 2003.

CLARK, E.A.; TRIKHA, M.; MARKLAND, F.S., et al. Structurally distinct disintegrins contortrostatin and multisquamatin differentially regulate platelet tyrosine phosphorylation. **J Biol Chem**, v.269 (35), p.21940-3, 1994.

CLAUSS, M.; WEICH, H.; BREIER, G., et al. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. **J Biol Chem**, v.271 (30), p.17629-34, 1996.

COELHO, A.L.; DE FREITAS, M.S.; MARIANO-OLIVEIRA, A., et al. RGD- and MLD-disintegrins, jarastatin and EC3, activate integrin-mediated signaling modulating the human neutrophils chemotaxis, apoptosis and IL-8 gene expression. **Exp Cell Res**, v.292 (2), p.371-84, 2004.

COELHO, A.L.; DE FREITAS, M.S.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L., et al. Effects of jarastatin, a novel snake venom disintegrin, on neutrophil migration and actin cytoskeleton dynamics. **Exp Cell Res**, v.251 (2), p.379-87, 1999.

COMINETTI, M.R.; RIBEIRO, J.U.; FOX, J.W., et al. BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from the Bothrops alternatus snake venom that interacts with alpha5beta1 integrin. **Arch Biochem Biophys**, v.416 (2), p.171-9, 2003.

COMINETTI, M.R.; TERRUGGI, C.H.; RAMOS, O.H., et al. Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. **J Biol Chem**, v.279 (18), p.18247-55, 2004.

COOKE, M.E.; SAKAI, T.; MOSHER, D.F. Contraction of collagen matrices mediated by alpha2beta1A and alpha(v)beta3 integrins. **J Cell Sci**, v.113 (Pt 13) p.2375-83, 2000.

COPPOLINO, M.G.; DEDHAR, S. Bi-directional signal transduction by integrin receptors. **Int J Biochem Cell Biol**, v.32 (2), p.171-88, 2000.

CORDES, N.; BEINKE, C. Fibronectin alters cell survival and intracellular signaling of confluent A549 cultures after irradiation. **Cancer Biol Ther**, v.3 (1), p.47-53, 2004.

CORDES, N.; BEINKE, C.; PLASSWILM, L., et al. Irradiation and various cytotoxic drugs enhance tyrosine phosphorylation and beta(1)-integrin clustering in human A549 lung cancer cells in a substratum-dependent manner in vitro. **Strahlenther Onkol**, v.180 (3), p.157-64, 2004.

CORDES, N.; SEIDLER, J.; DURZOK, R., et al. beta1-integrin-mediated signaling essentially contributes to cell survival after radiation-induced genotoxic injury. **Oncogene**, v.25 (9), p.1378-90, 2006.

CROSS, M.J.; DIXELIUS, J.; MATSUMOTO, T., et al. VEGF-receptor signal transduction. **Trends Biochem Sci**, v.28 (9), p.488-94, 2003.

CURLEY, G.P.; BLUM, H.; HUMPHRIES, M.J. Integrin antagonists. **Cell Mol Life Sci**, v.56 (5-6), p.427-41, 1999.

DALTRY, J.C.; WUSTER, W.; THORPE, R.S. Diet and snake venom evolution. **Nature**, v.379 (6565), p.537-40, 1996.

DAMIANO, J.S. Integrins as novel drug targets for overcoming innate drug resistance. **Curr Cancer Drug Targets**, v.2 (1), p.37-43, 2002.

DAMIANO, J.S.; DALTON, W.S. Integrin-mediated drug resistance in multiple myeloma. **Leuk Lymphoma**, v.38 (1-2), p.71-81, 2000.

DAMIANO, J.S.; HAZLEHURST, L.A.; DALTON, W.S. Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) protects the K562 chronic myelogenous leukemia cell line from apoptosis induced by BCR/ABL inhibition, cytotoxic drugs, and gamma-irradiation. **Leukemia**, v.15 (8), p.1232-9, 2001.

DANEN, E.H.; MARCINKIEWICZ, C.; CORNELISSEN, I.M., et al. The disintegrin eristostatin interferes with integrin alpha 4 beta 1 function and with experimental metastasis of human melanoma cells. **Exp Cell Res**, v.238 (1), p.188-96, 1998.

DANEN, E.H.; SONNENBERG, A. Integrins in regulation of tissue development and function. **J Pathol**, v.200 (4), p.471-80, 2003.

DANIAL, N.N.; KORSMEYER, S.J. Cell death: critical control points. **Cell**, v.116 (2), p.205-19, 2004.

DARDIK, R.; KAUFMANN, Y.; SAVION, N., et al. Platelets mediate tumor cell adhesion to the subendothelium under flow conditions: involvement of platelet GPIIb-IIIa and tumor cell alpha(v) integrins. **Int J Cancer**, v.70 (2), p.201-7, 1997.

DE MELKER, A.A.; SONNENBERG, A. Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events. **Bioessays**, v.21 (6), p.499-509, 1999.

DE VRIES, C.; ESCOBEDO, J.A.; UENO, H., et al. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. **Science**, v.255 (5047), p.989-91, 1992.

DELON, I.; BROWN, N.H. Integrins and the actin cytoskeleton. **Curr Opin Cell Biol**, v.19 (1), p.43-50, 2007.

DENNIS, M.S.; HENZEL, W.J.; PITTI, R.M., et al. Platelet glycoprotein IIb-IIIa protein antagonists from snake venoms: evidence for a family of platelet-aggregation inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.87 (7), p.2471-5, 1990.

DIAZ-GONZALEZ, F.; FORSYTH, J.; STEINER, B., et al. Trans-dominant inhibition of integrin function. **Mol Biol Cell**, v.7 (12), p.1939-51, 1996.

ECCLES, S.A. Parallels in invasion and angiogenesis provide pivotal points for therapeutic intervention. **Int J Dev Biol**, v.48 (5-6), p.583-98, 2004.

EDELMAN, G.M. Cell adhesion molecules. **Science**, v.219 (4584), p.450-7, 1983.

ELICEIRI, B.P.; KLEMKE, R.; STROMBLAD, S., et al. Integrin alphavbeta3 requirement for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis. **J Cell Biol**, v.140 (5), p.1255-63, 1998.

ELICES, M.J.; HEMLER, M.E. The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and a collagen/laminin receptor on others. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.86 (24), p.9906-10, 1989.

EPSTEIN, S.E.; KORNOWSKI, R.; FUCHS, S., et al. Angiogenesis therapy: amidst the hype, the neglected potential for serious side effects. **Circulation**, v.104 (1), p.115-9, 2001.

ETO, K.; HUET, C.; TARUI, T., et al. Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrin alpha 9beta 1: implications for sperm-egg binding and other cell interactions. **J Biol Chem**, v.277 (20), p.17804-10, 2002.

FAWCETT, J.; HARRIS, A.L. Cell adhesion molecules and cancer. **Curr Opin Oncol**, v.4 (1), p.142-8, 1992.

FERRARA, N.; ALITALO, K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. **Nat Med**, v.5 (12), p.1359-64, 1999.

FERRARA, N.; CARVER-MOORE, K.; CHEN, H., et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. **Nature**, v.380 (6573), p.439-42, 1996.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocr Rev**, v.18 (1), p.4-25, 1997.

FERRARA, N.; FRANTZ, G.; LECOATER, J., et al. Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. **Am J Pathol**, v.162 (6), p.1881-93, 2003.

FERRARA, N.; HENZEL, W.J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.161 (2), p.851-8, 1989.

FERRARA, N.; HOUCK, K.; JAKEMAN, L., et al. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. **Endocr Rev**, v.13 (1), p.18-32, 1992.

FOLKMAN, J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. **Ann Surg**, v.175 (3), p.409-16, 1972.

FOLKMAN, J. What is the role of angiogenesis in metastasis from cutaneous melanoma? **Eur J Cancer Clin Oncol**, v.23 (4), p.361-3, 1987.

FOLKMAN, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? **J Natl Cancer Inst**, v.82 (1), p.4-6, 1990.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nat Med**, v.1 (1), p.27-31, 1995.

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. **Science**, v.235 (4787), p.442-7, 1987.

FONG, G.H.; ROSSANT, J.; GERTSENSTEIN, M., et al. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. **Nature**, v.376 (6535), p.66-70, 1995.

FONG, G.H.; ZHANG, L.; BRYCE, D.M., et al. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. **Development**, v.126 (13), p.3015-25, 1999.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v.45 (8), p.969-85, 2005.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. **Proteomics**, v.8 (4), p.909-20, 2008.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS J**, v.275 (12), p.3016-30, 2008.

FRANCISCHETTI, I.M.; MY-PHAM, V.; HARRISON, J., et al. Bitis gabonica (Gaboon viper) snake venom gland: toward a catalog for the full-length transcripts (cDNA) and proteins. **Gene**, v.337 p.55-69, 2004.

FRIEDERICH, C.; TU, A.T. Role of metals in snake venoms for hemorrhagic, esterase and proteolytic activities. **Biochem Pharmacol**, v.20 (7), p.1549-56, 1971.

FRIEDLANDER, M.; BROOKS, P.C.; SHAFFER, R.W., et al. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. **Science**, v.270 (5241), p.1500-2, 1995.

FRISCH, S.M.; FRANCIS, H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. **J Cell Biol**, v.124 (4), p.619-26, 1994.

FRISCH, S.M.; SCRETON, R.A. Anoikis mechanisms. **Curr Opin Cell Biol**, v.13 (5), p.555-62, 2001.

FRY, B.G. Structure-function properties of venom components from Australian elapids. **Toxicon**, v.37 (1), p.11-32, 1999.

FUJII, Y.; OKUDA, D.; FUJIMOTO, Z., et al. Crystal structure of trimestatin, a disintegrin containing a cell adhesion recognition motif RGD. **J Mol Biol**, v.332 (5), p.1115-22, 2003.

FUJIMURA, Y.; IKEDA, Y.; MIURA, S., et al. Isolation and characterization of jararaca GPIIb-BP, a snake venom antagonist specific to platelet glycoprotein IIb. **Thromb Haemost**, v.74 (2), p.743-50, 1995.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v.288 (5789), p.373-6, 1980.

GAHMBERG, C.G.; FAGERHOLM, S.C.; NURMI, S.M., et al. Regulation of integrin activity and signalling. **Biochim Biophys Acta**, v.1790 (6), p.431-44, 2009.

GARDNER, H.; BROBERG, A.; POZZI, A., et al. Absence of integrin $\alpha 1\beta 1$ in the mouse causes loss of feedback regulation of collagen synthesis in normal and wounded dermis. **J Cell Sci**, v.112 (Pt 3) p.263-72, 1999.

GARNOTEL, R.; RITTIE, L.; POITEVIN, S., et al. Human blood monocytes interact with type I collagen through $\alpha x\beta 2$ integrin (CD11c-CD18, gp150-95). **J Immunol**, v.164 (11), p.5928-34, 2000.

GASMI, A.; SRAIRI, N.; GUERMAZI, S., et al. Amino acid structure and characterization of a heterodimeric disintegrin from *Vipera lebetina* venom. **Biochim Biophys Acta**, v.1547 (1), p.51-6, 2001.

GEHLSSEN, K.R.; DAVIS, G.E.; SRIRAMARAO, P. Integrin expression in human melanoma cells with differing invasive and metastatic properties. **Clin Exp Metastasis**, v.10 (2), p.111-20, 1992.

GEIGER, B.; BERSHADSKY, A.; PANKOV, R., et al. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.2 (11), p.793-805, 2001.

GERBER, H.P.; CONDORELLI, F.; PARK, J., et al. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. **J Biol Chem**, v.272 (38), p.23659-67, 1997.

GERBER, H.P.; DIXIT, V.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. **J Biol Chem**, v.273 (21), p.13313-6, 1998.

GIANCOTTI, F.G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. **Science**, v.285 (5430), p.1028-32, 1999.

GILMORE, A.P. Anoikis. **Cell Death Differ**, v.12 Suppl 2 p.1473-7, 2005.

GINSBERG, M.H.; PARTRIDGE, A.; SHATTIL, S.J. Integrin regulation. **Curr Opin Cell Biol**, v.17 (5), p.509-16, 2005.

GITAY-GOREN, H.; COHEN, T.; TESSLER, S., et al. Selective binding of VEGF121 to one of the three vascular endothelial growth factor receptors of vascular endothelial cells. **J Biol Chem**, v.271 (10), p.5519-23, 1996.

GOEL, H.L.; LANGUINO, L.R. Integrin signaling in cancer. **Cancer Treat Res**, v.119 p.15-31, 2004.

GOMES, N.; LEGRAND, C.; FAUVEL-LAFEVE, F. Shear stress induced release of von Willebrand factor and thrombospondin-1 in HUVEC extracellular matrix enhances breast tumour cell adhesion. **Clin Exp Metastasis**, v.22 (3), p.215-23, 2005.

GOMES, N.; VASSY, J.; LEBOS, C., et al. Breast adenocarcinoma cell adhesion to the vascular subendothelium in whole blood and under flow conditions: effects of alphavbeta3 and alphaIIbeta3 antagonists. **Clin Exp Metastasis**, v.21 (6), p.553-61, 2004.

GOTWALS, P.J.; CHI-ROSSO, G.; LINDNER, V., et al. The alpha1beta1 integrin is expressed during neointima formation in rat arteries and mediates collagen matrix reorganization. **J Clin Invest**, v.97 (11), p.2469-77, 1996.

GOULD, R.J.; POLOKOFF, M.A.; FRIEDMAN, P.A., et al. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.195 (2), p.168-71, 1990.

GRAMS, F.; HUBER, R.; KRESS, L.F., et al. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. **FEBS Lett**, v.335 (1), p.76-80, 1993.

GREEN, L.J.; MOULD, A.P.; HUMPHRIES, M.J. The integrin beta subunit. **Int J Biochem Cell Biol**, v.30 (2), p.179-84, 1998.

GRIFFIOEN, A.W.; MOLEMA, G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. **Pharmacol Rev**, v.52 (2), p.237-68, 2000.

GRINSTEIN, S.; ROTIN, D.; MASON, M.J. Na⁺/H⁺ exchange and growth factor-induced cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation. **Biochim Biophys Acta**, v.988 (1), p.73-97, 1989.

GRUNDSTROM, G.; MOSHER, D.F.; SAKAI, T., et al. Integrin alphavbeta3 mediates platelet-derived growth factor-BB-stimulated collagen gel contraction in cells expressing signaling deficient integrin alpha2beta1. **Exp Cell Res**, v.291 (2), p.463-73, 2003.

GUAN, J.L.; TREVITHICK, J.E.; HYNES, R.O. Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. **Cell Regul**, v.2 (11), p.951-64, 1991.

GUMBINER, B.M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**, v.84 (3), p.345-57, 1996.

GUO, W.; GIANCOTTI, F.G. Integrin signalling during tumour progression. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.5 (10), p.816-26, 2004.

GUTIERREZ, J.M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v.82 (9-10), p.841-50, 2000.

HAAS, T.A.; PLOW, E.F. Integrin-ligand interactions: a year in review. **Curr Opin Cell Biol**, v.6 (5), p.656-62, 1994.

HAIER, J.; NASRALLA, M.; NICOLSON, G.L. Different adhesion properties of highly and poorly metastatic HT-29 colon carcinoma cells with extracellular matrix components: role of integrin expression and cytoskeletal components. **Br J Cancer**, v.80 (12), p.1867-74, 1999.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100 (1), p.57-70, 2000.

HARLOZINSKA, A. Progress in molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. **Anticancer Res**, v.25 (5), p.3327-33, 2005.

HARRIS, A.L. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. **Nat Rev Cancer**, v.2 (1), p.38-47, 2002.

HART, S.L.; HARBOTTLE, R.P.; COOPER, R., et al. Gene delivery and expression mediated by an integrin-binding peptide. **Gene Ther**, v.2 (8), p.552-4, 1995.

HAZLEHURST, L.A.; DAMIANO, J.S.; BUYUKSAL, I., et al. Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR). **Oncogene**, v.19 (38), p.4319-27, 2000.

HEATH, V.L.; BICKNELL, R. Anticancer strategies involving the vasculature. **Nat Rev Clin Oncol**, v.6 (7), p.395-404, 2009.

HIRATSUKA, S.; MARU, Y.; OKADA, A., et al. Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. **Cancer Res**, v.61 (3), p.1207-13, 2001.

HIRATSUKA, S.; MINOWA, O.; KUNO, J., et al. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95 (16), p.9349-54, 1998.

HIRATSUKA, S.; NAKAMURA, K.; IWAI, S., et al. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. **Cancer Cell**, v.2 (4), p.289-300, 2002.

HITE, L.A.; JIA, L.G.; BJARNASON, J.B., et al. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch Biochem Biophys**, v.308 (1), p.182-91, 1994.

HONG, S.Y.; KOH, Y.S.; CHUNG, K.H., et al. Snake venom disintegrin, saxatilin, inhibits platelet aggregation, human umbilical vein endothelial cell proliferation, and smooth muscle cell migration. **Thromb Res**, v.105 (1), p.79-86, 2002.

HONN, K.V.; TANG, D.G. Adhesion molecules and tumor cell interaction with endothelium and subendothelial matrix. **Cancer Metastasis Rev**, v.11 (3-4), p.353-75, 1992.

HONN, K.V.; TANG, D.G.; CRISSMAN, J.D. Platelets and cancer metastasis: a causal relationship? **Cancer Metastasis Rev**, v.11 (3-4), p.325-51, 1992.

HORWITZ, A.F.; HUNTER, T. Cell adhesion: integrating circuitry. **Trends Cell Biol**, v.6 (12), p.460-1, 1996.

HUANG, T.F. What have snakes taught us about integrins? **Cell Mol Life Sci**, v.54 (6), p.527-40, 1998.

HUANG, T.F.; HOLT, J.C.; LUKASIEWICZ, H., et al. Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. **J Biol Chem**, v.262 (33), p.16157-63, 1987.

HUANG, T.F.; YEH, C.H.; WU, W.B. Viper venom components affecting angiogenesis. **Haemostasis**, v.31 (3-6), p.192-206, 2001.

HUMPHRIES, J.D.; BYRON, A.; HUMPHRIES, M.J. Integrin ligands at a glance. **J Cell Sci**, v.119 (Pt 19), p.3901-3, 2006.

HUMPHRIES, M.J. The molecular basis and specificity of integrin-ligand interactions. **J Cell Sci**, v.97 (Pt 4) p.585-92, 1990.

HUMPHRIES, M.J. Integrin structure. **Biochem Soc Trans**, v.28 (4), p.311-39, 2000.

HUMPHRIES, M.J.; MCEWAN, P.A.; BARTON, S.J., et al. Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. **Trends Biochem Sci**, v.28 (6), p.313-20, 2003.

HYNES, R.O. Integrins: a family of cell surface receptors. **Cell**, v.48 (4), p.549-54, 1987.

HYNES, R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, v.69 (1), p.11-25, 1992.

HYNES, R.O. Cell adhesion: old and new questions. **Trends Cell Biol**, v.9 (12), p.M33-7, 1999.

HYNES, R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, v.110 (6), p.673-87, 2002.

IBA, K.; ALBRECHTSEN, R.; GILPIN, B.J., et al. Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion. **Am J Pathol**, v.154 (5), p.1489-501, 1999.

INCARDONA, F.; CALVO, F.; FAUVEL-LAFEVE, F., et al. Involvement of thrombospondin in the adherence of human breast-adenocarcinoma cells: a possible role in the metastatic process. **Int J Cancer**, v.55 (3), p.471-7, 1993.

INGBER, D.E.; PRUSTY, D.; FRANGIONI, J.V., et al. Control of intracellular pH and growth by fibronectin in capillary endothelial cells. **J Cell Biol**, v.110 (5), p.1803-11, 1990.

ISHIKAWA, F.; MIYAZONO, K.; HELLMAN, U., et al. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. **Nature**, v.338 (6216), p.557-62, 1989.

IVANKOVIC-DIKIC, I.; GRONROOS, E.; BLAUKAT, A., et al. Pyk2 and FAK regulate neurite outgrowth induced by growth factors and integrins. **Nat Cell Biol**, v.2 (9), p.574-81, 2000.

JAFFE, E.A.; NACHMAN, R.L.; BECKER, C.G., et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. **J Clin Invest**, v.52 (11), p.2745-56, 1973.

JAIN, R.K. Molecular regulation of vessel maturation. **Nat Med**, v.9 (6), p.685-93, 2003.

JANES, S.M.; WATT, F.M. New roles for integrins in squamous-cell carcinoma. **Nat Rev Cancer**, v.6 (3), p.175-83, 2006.

JIA, L.G.; WANG, X.M.; SHANNON, J.D., et al. Function of disintegrin-like/cysteine-rich domains of atrolysin A. Inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists. **J Biol Chem**, v.272 (20), p.13094-102, 1997.

JIA, L.G.; WANG, X.M.; SHANNON, J.D., et al. Inhibition of platelet aggregation by the recombinant cysteine-rich domain of the hemorrhagic snake venom metalloproteinase, atrolysin A. **Arch Biochem Biophys**, v.373 (1), p.281-6, 2000.

JOHNSON, E.K.; OWNBY, C.L. Isolation of a hemorrhagic toxin from the venom of *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broad-banded copperhead) and pathogenesis of the hemorrhage induced by the toxin in mice. **Int J Biochem**, v.25 (2), p.267-78, 1993.

KAMATA, T.; TAKADA, Y. Direct binding of collagen to the I domain of integrin alpha 2 beta 1 (VLA-2, CD49b/CD29) in a divalent cation-independent manner. **J Biol Chem**, v.269 (42), p.26006-10, 1994.

KAMIGUTI, A.S.; GALLAGHER, P.; MARCINKIEWICZ, C., et al. Identification of sites in the cysteine-rich domain of the class P-III snake venom metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function. **FEBS Lett**, v.549 (1-3), p.129-34, 2003.

KAMIGUTI, A.S.; HAY, C.R.; THEAKSTON, R.D., et al. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v.34 (6), p.627-42, 1996.

KANG, I.C.; KIM, D.S.; JANG, Y., et al. Suppressive mechanism of salmosin, a novel disintegrin in B16 melanoma cell metastasis. **Biochem Biophys Res Commun**, v.275 (1), p.169-73, 2000.

KANG, I.C.; LEE, Y.D.; KIM, D.S. A novel disintegrin salmosin inhibits tumor angiogenesis. **Cancer Res**, v.59 (15), p.3754-60, 1999.

KAUSKOT, A.; COMINETTI, M.R.; RAMOS, O.H., et al. Hemostatic effects of recombinant DisBa-01, a disintegrin from *Bothrops alternatus*. **Front Biosci**, v.13 p.6604-16, 2008.

KENDALL, R.L.; THOMAS, K.A. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.90 (22), p.10705-9, 1993.

KERN, A.; BRIESEWITZ, R.; BANK, I., et al. The role of the I domain in ligand binding of the human integrin alpha 1 beta 1. **J Biol Chem**, v.269 (36), p.22811-6, 1994.

KERN, A.; EBLE, J.; GOLBIK, R., et al. Interaction of type IV collagen with the isolated integrins alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1. **Eur J Biochem**, v.215 (1), p.151-9, 1993.

KEYT, B.A.; NGUYEN, H.V.; BERLEAU, L.T., et al. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. **J Biol Chem**, v.271 (10), p.5638-46, 1996.

KIM, K.J.; LI, B.; WINER, J., et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. **Nature**, v.362 (6423), p.841-4, 1993.

KIM, S.; BELL, K.; MOUSA, S.A., et al. Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin. **Am J Pathol**, v.156 (4), p.1345-62, 2000.

KIM, S.I.; KIM, K.S.; KIM, H.S., et al. Inhibition of angiogenesis by salmosin expressed in vitro. **Oncol Res**, v.14 (4-5), p.227-33, 2004.

KINASHI, T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. **Nat Rev Immunol**, v.5 (7), p.546-59, 2005.

KINBARA, K.; GOLDFINGER, L.E.; HANSEN, M., et al. Ras GTPases: integrins' friends or foes? **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.4 (10), p.767-76, 2003.

KINI, R.M.; EVANS, H.J. Inhibition of platelet aggregation by a fibrinogenase from *Naja nigricollis* venom is independent of fibrinogen degradation. **Biochim Biophys Acta**, v.1095 (2), p.117-21, 1991.

KITAYAMA, J.; NAGAWA, H.; TSUNO, N., et al. Laminin mediates tethering and spreading of colon cancer cells in physiological shear flow. **Br J Cancer**, v.80 (12), p.1927-34, 1999.

KLAGSBRUN, M.; D'AMORE, P.A. Regulators of angiogenesis. **Annu Rev Physiol**, v.53 p.217-39, 1991.

KLAUS, W.; BROGER, C.; GERBER, P., et al. Determination of the disulphide bonding pattern in proteins by local and global analysis of nuclear magnetic resonance data. Application to flavoridin. **J Mol Biol**, v.232 (3), p.897-906, 1993.

KLEIN, C.E.; STEINMAYER, T.; KAUFMANN, D., et al. Identification of a melanoma progression antigen as integrin VLA-2. **J Invest Dermatol**, v.96 (2), p.281-4, 1991.

KOCHVA, E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon**, v.25 (1), p.65-106, 1987.

KORNBERG, L.J.; EARP, H.S.; TURNER, C.E., et al. Signal transduction by integrins: increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering of beta 1 integrins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.88 (19), p.8392-6, 1991.

- KUKK, E.; LYMBOUSSAKI, A.; TAIRA, S., et al. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. **Development**, v.122 (12), p.3829-37, 1996.
- KVANSAKUL, M.; ADAMS, J.C.; HOHENESTER, E. Structure of a thrombospondin C-terminal fragment reveals a novel calcium core in the type 3 repeats. **EMBO J**, v.23 (6), p.1223-33, 2004.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227 (5259), p.680-5, 1970.
- LAFRENIE, R.M.; LEE, S.F.; HEWLETT, I.K., et al. Involvement of integrin alphavbeta3 in the pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection in monocytes. **Virology**, v.297 (1), p.31-8, 2002.
- LAHAM, R.J.; SELLKE, F.W.; EDELMAN, E.R., et al. Local perivascular delivery of basic fibroblast growth factor in patients undergoing coronary bypass surgery: results of a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Circulation**, v.100 (18), p.1865-71, 1999.
- LALLOO, D.G.; TREVETT, A.J.; SAWERI, A., et al. The epidemiology of snake bite in Central Province and National Capital District, Papua New Guinea. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.89 (2), p.178-82, 1995.
- LASKY, L.A. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. **Science**, v.258 (5084), p.964-9, 1992.
- LI, S.; GUAN, J.L.; CHIEN, S. Biochemistry and biomechanics of cell motility. **Annu Rev Biomed Eng**, v.7 p.105-50, 2005.
- LIAPIS, H.; FLATH, A.; KITAZAWA, S. Integrin alpha V beta 3 expression by bone-residing breast cancer metastases. **Diagn Mol Pathol**, v.5 (2), p.127-35, 1996.
- LICHTNER, R.B.; HOWLETT, A.R.; LERCH, M., et al. Negative cooperativity between alpha 3 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins in human mammary carcinoma MDA MB 231 cells. **Exp Cell Res**, v.240 (2), p.368-76, 1998.
- LIOTTA, L.A.; STEEG, P.S.; STETLER-STEVENSON, W.G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. **Cell**, v.64 (2), p.327-36, 1991.
- LIU, S.; CALDERWOOD, D.A.; GINSBERG, M.H. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. **J Cell Sci**, v.113 (Pt 20) p.3563-71, 2000.
- LO, S.H.; CHEN, L.B. Focal adhesion as a signal transduction organelle. **Cancer Metastasis Rev**, v.13 (1), p.9-24, 1994.
- LOFTUS, J.C.; SMITH, J.W.; GINSBERG, M.H. Integrin-mediated cell adhesion: the extracellular face. **J Biol Chem**, v.269 (41), p.25235-8, 1994.

LU, H.; OUYANG, W.; HUANG, C. Inflammation, a key event in cancer development. **Mol Cancer Res**, v.4 (4), p.221-33, 2006.

LU, X.; RAHMAN, S.; KAKKAR, V.V., et al. Substitutions of proline 42 to alanine and methionine 46 to asparagine around the RGD domain of the neurotoxin dendroaspin alter its preferential antagonism to that resembling the disintegrin elegantin. **J Biol Chem**, v.271 (1), p.289-94, 1996.

LUKASHEV, M.E.; SHEPPARD, D.; PYTELA, R. Disruption of integrin function and induction of tyrosine phosphorylation by the autonomously expressed beta 1 integrin cytoplasmic domain. **J Biol Chem**, v.269 (28), p.18311-4, 1994.

LUNDSTROM, A.; HOLMBOM, J.; LINDQVIST, C., et al. The role of alpha2 beta1 and alpha3 beta1 integrin receptors in the initial anchoring of MDA-MB-231 human breast cancer cells to cortical bone matrix. **Biochem Biophys Res Commun**, v.250 (3), p.735-40, 1998.

LUO, B.H.; CARMAN, C.V.; SPRINGER, T.A. Structural basis of integrin regulation and signaling. **Annu Rev Immunol**, v.25 p.619-47, 2007.

LUTTUN, A.; TJWA, M.; MOONS, L., et al. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. **Nat Med**, v.8 (8), p.831-40, 2002.

LYDEN, D.; HATTORI, K.; DIAS, S., et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. **Nat Med**, v.7 (11), p.1194-201, 2001.

MAEMURA, M.; AKIYAMA, S.K.; WOODS, V.L., JR., et al. Expression and ligand binding of alpha 2 beta 1 integrin on breast carcinoma cells. **Clin Exp Metastasis**, v.13 (4), p.223-35, 1995.

MAGLIONE, D.; GUERRIERO, V.; VIGLIETTO, G., et al. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.88 (20), p.9267-71, 1991.

MAHER, D.; WU, X.; SCHACKER, T., et al. HIV binding, penetration, and primary infection in human cervicovaginal tissue. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.102 (32), p.11504-9, 2005.

MANN, D.R.; PLANT, T.M. Leptin and pubertal development. **Semin Reprod Med**, v.20 (2), p.93-102, 2002.

MARCINKIEWICZ, C. Functional characteristic of snake venom disintegrins: potential therapeutic implication. **Curr Pharm Des**, v.11 (7), p.815-27, 2005.

MARCINKIEWICZ, C.; CALVETE, J.J.; MARCINKIEWICZ, M.M., et al. EC3, a novel heterodimeric disintegrin from *Echis carinatus* venom, inhibits alpha4 and alpha5 integrins in an RGD-independent manner. **J Biol Chem**, v.274 (18), p.12468-73, 1999.

MARCINKIEWICZ, C.; CALVETE, J.J.; VIJAY-KUMAR, S., et al. Structural and functional characterization of EMF10, a heterodimeric disintegrin from *Eristocophis macmahoni* venom that selectively inhibits alpha 5 beta 1 integrin. **Biochemistry**, v.38 (40), p.13302-9, 1999.

MARCINKIEWICZ, C.; LOBB, R.R.; MARCINKIEWICZ, M.M., et al. Isolation and characterization of EMS16, a C-lectin type protein from *Echis multisquamatus* venom, a potent and selective inhibitor of the alpha2beta1 integrin. **Biochemistry**, v.39 (32), p.9859-67, 2000.

MARIANO-OLIVEIRA, A.; COELHO, A.L.; TERRUGGI, C.H., et al. Alternagin-C, a nonRGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. **Eur J Biochem**, v.270 (24), p.4799-808, 2003.

MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v.36 (12), p.1749-800, 1998.

MARSH, N.A. Snake venoms affecting the haemostatic mechanism--a consideration of their mechanisms, practical applications and biological significance. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v.5 (3), p.399-410, 1994.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim Biophys Acta**, v.1477 (1-2), p.146-56, 2000.

MAYNE, R. Collagenous proteins of blood vessels. **Arteriosclerosis**, v.6 (6), p.585-93, 1986.

MCLANE, M.A.; MARCINKIEWICZ, C.; VIJAY-KUMAR, S., et al. Viper venom disintegrins and related molecules. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.219 (2), p.109-19, 1998.

MCLANE, M.A.; VIJAY-KUMAR, S.; MARCINKIEWICZ, C., et al. Importance of the structure of the RGD-containing loop in the disintegrins echistatin and eristostatin for recognition of alpha IIb beta 3 and alpha v beta 3 integrins. **FEBS Lett**, v.391 (1-2), p.139-43, 1996.

MESQUITA-FERRARI, R.A.; de MORAES, C.K., MICOCCI, K.C. et al. ALT-C, a disintegrin-like cys-rich protein from *Bothrops alternatus*, increases skeletal myoblast viability. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis**. v.15 (2), p.325-339, 2009.

MEYER, A.; AUERNHEIMER, J.; MODLINGER, A., et al. Targeting RGD recognizing integrins: drug development, biomaterial research, tumor imaging and targeting. **Curr Pharm Des**, v.12 (22), p.2723-47, 2006.

MIRANTI, C.K.; BRUGGE, J.S. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. **Nat Cell Biol**, v.4 (4), p.E83-90, 2002.

MIYAMOTO, S.; TERAMOTO, H.; GUTKIND, J.S., et al. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation:

roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. **J Cell Biol**, v.135 (6 Pt 1), p.1633-42, 1996.

MIZEJEWSKI, G.J. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.222 (2), p.124-38, 1999.

MONLEON, D.; ESTEVE, V.; KOVACS, H., et al. Conformation and concerted dynamics of the integrin-binding site and the C-terminal region of echistatin revealed by homonuclear NMR. **Biochem J**, v.387 (Pt 1), p.57-66, 2005.

MONLEON, D.; MORENO-MURCIANO, M.P.; KOVACS, H., et al. Concerted motions of the integrin-binding loop and the C-terminal tail of the non-RGD disintegrin obtustatin. **J Biol Chem**, v.278 (46), p.45570-6, 2003.

MORENO-MURCIANO, M.P.; MONLEON, D.; CALVETE, J.J., et al. Amino acid sequence and homology modeling of obtustatin, a novel non-RGD-containing short disintegrin isolated from the venom of *Vipera lebetina obtusa*. **Protein Sci**, v.12 (2), p.366-71, 2003.

MORO, L.; VENTURINO, M.; BOZZO, C., et al. Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. **EMBO J**, v.17 (22), p.6622-32, 1998.

MORRIS, V.L.; SCHMIDT, E.E.; KOOP, S., et al. Effects of the disintegrin eristostatin on individual steps of hematogenous metastasis. **Exp Cell Res**, v.219 (2), p.571-8, 1995.

MOURA-DA-SILVA, A.M.; MARCINKIEWICZ, C.; MARCINKIEWICZ, M., et al. Selective recognition of alpha2beta1 integrin by jararhagin, a Metalloproteinase/disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. **Thromb Res**, v.102 (2), p.153-9, 2001.

MUNDY, G.R. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. **Nat Rev Cancer**, v.2 (8), p.584-93, 2002.

MURAKAMI, M.; IWAI, S.; HIRATSUKA, S., et al. Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocytes/macrophages. **Blood**, v.108 (6), p.1849-56, 2006.

MUSCHLER, J.; LEVY, D.; BOUDREAU, R., et al. A role for dystroglycan in epithelial polarization: loss of function in breast tumor cells. **Cancer Res**, v.62 (23), p.7102-9, 2002.

NAGY, J.A.; VASILE, E.; FENG, D., et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. **J Exp Med**, v.196 (11), p.1497-506, 2002.

NEUFELD, G.; COHEN, T.; GITAY-GOREN, H., et al. Similarities and differences between the vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants. **Cancer Metastasis Rev**, v.15 (2), p.153-8, 1996.

NG, Y.S.; KRILLEKE, D.; SHIMA, D.T. VEGF function in vascular pathogenesis. **Exp Cell Res**, v.312 (5), p.527-37, 2006.

NIERODZIK, M.L.; KLEPFISH, A.; KARPATKIN, S. Role of platelets, thrombin, integrin IIb-IIIa, fibronectin and von Willebrand factor on tumor adhesion in vitro and metastasis in vivo. **Thromb Haemost**, v.74 (1), p.282-90, 1995.

NIESWANDT, B.; HAFNER, M.; ECHTENACHER, B., et al. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. **Cancer Res**, v.59 (6), p.1295-300, 1999.

NIEWIAROWSKI, S.; MCLANE, M.A.; KLOCZEWIAK, M., et al. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Semin Hematol**, v.31 (4), p.289-300, 1994.

NIIDA, S.; KAKU, M.; AMANO, H., et al. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. **J Exp Med**, v.190 (2), p.293-8, 1999.

NIKAI, T.; TANIGUCHI, K.; KOMORI, Y., et al. Primary structure and functional characterization of bilitoxin-1, a novel dimeric P-II snake venom metalloproteinase from *Agkistrodon bilineatus* venom. **Arch Biochem Biophys**, v.378 (1), p.6-15, 2000.

NISHIDA, S.; FUJITA, T.; KOHNO, N., et al. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of prothrombin activator (ecarin) from Kenyan *Echis carinatus* venom. **Biochemistry**, v.34 (5), p.1771-8, 1995.

NYKVIST, P.; TU, H.; IVASKA, J., et al. Distinct recognition of collagen subtypes by alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins. Alpha(1)beta(1) mediates cell adhesion to type XIII collagen. **J Biol Chem**, v.275 (11), p.8255-61, 2000.

O'CONNOR, P. Natalizumab and the role of alpha 4-integrin antagonism in the treatment of multiple sclerosis. **Expert Opin Biol Ther**, v.7 (1), p.123-36, 2007.

OHM, J.E.; CARBONE, D.P. VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency. **Immunol Res**, v.23 (2-3), p.263-72, 2001.

OHM, J.E.; GABRILOVICH, D.I.; SEMPOWSKI, G.D., et al. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. **Blood**, v.101 (12), p.4878-86, 2003.

OKUDA, D.; KOIKE, H.; MORITA, T. A new gene structure of the disintegrin family: a subunit of dimeric disintegrin has a short coding region. **Biochemistry**, v.41 (48), p.14248-54, 2002.

OKUDA, D.; MORITA, T. Purification and characterization of a new RGD/KGD-containing dimeric disintegrin, piscivostatin, from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*: the unique effect of piscivostatin on platelet aggregation. **J Biochem**, v.130 (3), p.407-15, 2001.

OLSSON, A.K.; DIMBERG, A.; KREUGER, J., et al. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.7 (5), p.359-71, 2006.

ORR, A.W.; GINSBERG, M.H.; SHATTIL, S.J., et al. Matrix-specific suppression of integrin activation in shear stress signaling. **Mol Biol Cell**, v.17 (11), p.4686-97, 2006.

OURSLER, M.J.; SPELSBERG, T.C. Echistatin, a potential new drug for osteoporosis. **Endocrinology**, v.132 (3), p.939-40, 1993.

OUYANG, C.; YEH, H.I.; HUANG, T.F. A potent platelet aggregation inhibitor purified from *Agkistrodon halys* (mamushi) snake venom. **Toxicon**, v.21 (6), p.797-804, 1983.

PAINE, M.J.; DESMOND, H.P.; THEAKSTON, R.D., et al. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. **J Biol Chem**, v.267 (32), p.22869-76, 1992.

PAMPORI, N.; HATO, T.; STUPACK, D.G., et al. Mechanisms and consequences of affinity modulation of integrin $\alpha(V)\beta(3)$ detected with a novel patch-engineered monovalent ligand. **J Biol Chem**, v.274 (31), p.21609-16, 1999.

PARISE, L.V.; LEE, J.; JULIANO, R.L. New aspects of integrin signaling in cancer. **Semin Cancer Biol**, v.10 (6), p.407-14, 2000.

PARK, C.C.; ZHANG, H.; PALLAVICINI, M., et al. $\beta(1)$ integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo. **Cancer Res**, v.66 (3), p.1526-35, 2006.

PARK, D.; KANG, I.; KIM, H., et al. Cloning and characterization of novel disintegrins from *Agkistrodon halys* venom. **Mol Cells**, v.8 (5), p.578-84, 1998.

PARK, J.E.; CHEN, H.H.; WINER, J., et al. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. **J Biol Chem**, v.269 (41), p.25646-54, 1994.

PARK, J.E.; KELLER, G.A.; FERRARA, N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. **Mol Biol Cell**, v.4 (12), p.1317-26, 1993.

PARSONS, J.T.; PARSONS, S.J. Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. **Curr Opin Cell Biol**, v.9 (2), p.187-92, 1997.

PATARROYO, M.; TRYGGVASON, K.; VIRTANEN, I. Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. **Semin Cancer Biol**, v.12 (3), p.197-207, 2002.

PECHEUR, I.; PEYRUCHAUD, O.; SERRE, C.M., et al. Integrin $\alpha(v)\beta(3)$ expression confers on tumor cells a greater propensity to metastasize to bone. **FASEB J**, v.16 (10), p.1266-8, 2002.

PEROU, C.M.; SORLIE, T.; EISEN, M.B., et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v.406 (6797), p.747-52, 2000.

PFAFF, M.; MCLANE, M.A.; BEVIGLIA, L., et al. Comparison of disintegrins with limited variation in the RGD loop in their binding to purified integrins alpha IIb beta 3, alpha V beta 3 and alpha 5 beta 1 and in cell adhesion inhibition. **Cell Adhes Commun**, v.2 (6), p.491-501, 1994.

PIERCE, E.A.; FOLEY, E.D.; SMITH, L.E. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. **Arch Ophthalmol**, v.114 (10), p.1219-28, 1996.

PIERSCHBACHER, M.D.; RUOSLAHTI, E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. **Nature**, v.309 (5963), p.30-3, 1984.

PIGNATELLI, M.; CARDILLO, M.R.; HANBY, A., et al. Integrins and their accessory adhesion molecules in mammary carcinomas: loss of polarization in poorly differentiated tumors. **Hum Pathol**, v.23 (10), p.1159-66, 1992.

PIGNATELLI, M.; STAMP, G. Integrins in tumour development and spread. **Cancer Surv**, v.24 p.113-27, 1995.

PINTO, A.F.; TERRA, R.M.; GUIMARAES, J.A., et al. Mapping von Willebrand factor A domain binding sites on a snake venom metalloproteinase cysteine-rich domain. **Arch Biochem Biophys**, v.457 (1), p.41-6, 2007.

PLATE, K.H.; BREIER, G.; WEICH, H.A., et al. Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms. **Int J Cancer**, v.59 (4), p.520-9, 1994.

PLOW, E.F.; HAAS, T.A.; ZHANG, L., et al. Ligand binding to integrins. **J Biol Chem**, v.275 (29), p.21785-8, 2000.

PORTER, J.C.; HOGG, N. Integrins take partners: cross-talk between integrins and other membrane receptors. **Trends Cell Biol**, v.8 (10), p.390-6, 1998.

POST, M.J.; LAHAM, R.; SELLKE, F.W., et al. Therapeutic angiogenesis in cardiology using protein formulations. **Cardiovasc Res**, v.49 (3), p.522-31, 2001.

PROCKOP, D.J.; KIVIRIKKO, K.I. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. **Annu Rev Biochem**, v.64 p.403-34, 1995.

QIAN, F.; ZHANG, Z.C.; WU, X.F., et al. Interaction between integrin alpha(5) and fibronectin is required for metastasis of B16F10 melanoma cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.333 (4), p.1269-75, 2005.

RACINE-SAMSON, L.; ROCKEY, D.C.; BISSELL, D.M. The role of alpha1beta1 integrin in wound contraction. A quantitative analysis of liver myofibroblasts in vivo and in primary culture. **J Biol Chem**, v.272 (49), p.30911-7, 1997.

RAFII, S.; MEEUS, S.; DIAS, S., et al. Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. **Semin Cell Dev Biol**, v.13 (1), p.61-7, 2002.

RAHIMI, N.; DAYANIR, V.; LASHKARI, K. Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. **J Biol Chem**, v.275 (22), p.16986-92, 2000.

RAHMAN, S.; AITKEN, A.; FLYNN, G., et al. Modulation of RGD sequence motifs regulates disintegrin recognition of alphaIIb beta3 and alpha5 beta1 integrin complexes. Replacement of elegantin alanine-50 with proline, N-terminal to the RGD sequence, diminishes recognition of the alpha5 beta1 complex with restoration induced by Mn²⁺ cation. **Biochem J**, v.335 (Pt 2) p.247-57, 1998.

RAHMAN, S.; FLYNN, G.; AITKEN, A., et al. Differential recognition of snake venom proteins expressing specific Arg-Gly-Asp (RGD) sequence motifs by wild-type and variant integrin alphaIIbbeta3: further evidence for distinct sites of RGD ligand recognition exhibiting negative allostery. **Biochem J**, v.345 Pt 3 p.701-9, 2000.

RAMACHANDRA, M.; ATENCIO, I.; RAHMAN, A., et al. Restoration of transforming growth factor Beta signaling by functional expression of smad4 induces anoikis. **Cancer Res**, v.62 (21), p.6045-51, 2002.

RAMOS, O.H.; KAUSKOT, A.; COMINETTI, M.R., 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**, v.25 (1), p.53-64, 2008.

RAMOS, O.H.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Snake venom metalloproteases--structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v.142 (3-4), p.328-46, 2006.

RAMOS, O.H.; TERRUGGI, C.H.; RIBEIRO, J.U., et al. Modulation of in vitro and in vivo angiogenesis by alternagin-C, a disintegrin-like protein from Bothrops alternatus snake venom and by a peptide derived from its sequence. **Arch Biochem Biophys**, v.461 (1), p.1-6, 2007.

RAY, S.; CHATTOPADHYAY, N.; BISWAS, N., et al. Regulatory molecules in tumor metastasis. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**, v.18 (4), p.251-9, 1999.

REICHARDT, L. (1999). Extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins. Extracellular matrix molecules and their receptors-Introduction. T. a. V. R. Kreis: 335-344.

RISSANEN, T.T.; VAJANTO, I.; YLA-HERTTUALA, S. Gene therapy for therapeutic angiogenesis in critically ischaemic lower limb - on the way to the clinic. **Eur J Clin Invest**, v.31 (8), p.651-66, 2001.

RITTER, M.R.; MARKLAND, F.S., JR. Contortrostatin activates ERK2 and tyrosine phosphorylation events via distinct pathways. **Biochem Biophys Res Commun**, v.274 (1), p.142-8, 2000.

RITTER, M.R.; MARKLAND, F.S., JR. Differential regulation of tyrosine phosphorylation in tumor cells by contortrostatin, a homodimeric disintegrin, and monomeric disintegrins echistatin and flavoridin. **Toxicon**, v.39 (2-3), p.283-9, 2001.

ROBINSON, C.J.; STRINGER, S.E. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. **J Cell Sci**, v.114 (Pt 5), p.853-65, 2001.

RODRIGUES, F.G.; PETRETSKI, J.H.; KANASHIRO, M.M., et al. The complement system is involved in acute inflammation but not in the hemorrhage produced by a Bothrops atrox snake venom low molecular mass proteinase. **Mol Immunol**, v.40 (16), p.1149-56, 2004.

ROSE, D.M.; ALON, R.; GINSBERG, M.H. Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. **Immunol Rev**, v.218 p.126-34, 2007.

ROSENGART, T.K.; LEE, L.Y.; PATEL, S.R., et al. Six-month assessment of a phase I trial of angiogenic gene therapy for the treatment of coronary artery disease using direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing the VEGF121 cDNA. **Ann Surg**, v.230 (4), p.466-70; discussion 470-2, 1999.

RUCAVADO, A.; FLORES-SANCHEZ, E.; FRANCESCHI, A., et al. Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from Lachesis muta muta snake venom. **Toxicon**, v.37 (9), p.1297-312, 1999.

RUCINSKI, B.; NIEWIAROWSKI, S.; HOLT, J.C., et al. Batroxostatin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide from Bothrops atrox, is a potent inhibitor of platelet aggregation and cell interaction with fibronectin. **Biochim Biophys Acta**, v.1054 (3), p.257-62, 1990.

RUOSLAHTI, E. The Walter Herbert Lecture. Control of cell motility and tumour invasion by extracellular matrix interactions. **Br J Cancer**, v.66 (2), p.239-42, 1992.

RUOSLAHTI, E.; GIANCOTTI, F.G. Integrins and tumor cell dissemination. **Cancer Cells**, v.1 (4), p.119-26, 1989.

RUOSLAHTI, E.; PIERSCHBACHER, M.D. Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. **Cell**, v.44 (4), p.517-8, 1986.

RUOSLAHTI, E.; PIERSCHBACHER, M.D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. **Science**, v.238 (4826), p.491-7, 1987.

RUSNATI, M.; TANGHETTI, E.; DELL'ERA, P., et al. α v β 3 integrin mediates the cell-adhesive capacity and biological activity of basic fibroblast growth factor (FGF-2) in cultured endothelial cells. **Mol Biol Cell**, v.8 (12), p.2449-61, 1997.

SALVEN, P.; RUOTSALAINEN, T.; MATTSON, K., et al. High pre-treatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer. **Int J Cancer**, v.79 (2), p.144-6, 1998.

SANT'ANNA, E.M.C.; GOUVÊA, C.M.C.P., NAKAIE, C.R. et al. Angiogenesis and growth factor modulation induced by alternagin C, a snake venom disintegrin-like, cysteine-rich protein on a rat skin wound model. **Arch of Bioch and Biophys**, v.479, p.20-27, 2008

SARANTOS, M.R.; RAYCHAUDHURI, S.; LUM, A.F., et al. Leukocyte function-associated antigen 1-mediated adhesion stability is dynamically regulated through affinity and valency during bond formation with intercellular adhesion molecule-1. **J Biol Chem**, v.280 (31), p.28290-8, 2005.

SAUDEK, V.; ATKINSON, R.A.; PELTON, J.T. Three-dimensional structure of echistatin, the smallest active RGD protein. **Biochemistry**, v.30 (30), p.7369-72, 1991.

SAWANO, A.; TAKAHASHI, T.; YAMAGUCHI, S., et al. Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. **Cell Growth Differ**, v.7 (2), p.213-21, 1996.

SCARBOROUGH, R.M.; ROSE, J.W.; NAUGHTON, M.A., et al. Characterization of the integrin specificities of disintegrins isolated from American pit viper venoms. **J Biol Chem**, v.268 (2), p.1058-65, 1993.

SCHALLER, M.D.; PARSONS, J.T. Focal adhesion kinase and associated proteins. **Curr Opin Cell Biol**, v.6 (5), p.705-10, 1994.

SCHLAEPFER, D.D.; HUNTER, T. Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? **Trends Cell Biol**, v.8 (4), p.151-7, 1998.

SCHUMACHER, B.; PECHER, P.; VON SPECHT, B.U., et al. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. **Circulation**, v.97 (7), p.645-50, 1998.

SCHWARTZ, M.A.; SCHALLER, M.D.; GINSBERG, M.H. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.11 p.549-99, 1995.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; DE SOUZA, E.L.; BELTRAMINI, L.M., et al. Expression, refolding, and activity of a recombinant nonhemorrhagic snake venom metalloprotease. **Protein Expr Purif**, v.19 (1), p.41-7, 2000.

SELISTRE DE ARAÚJO, H.S.; DE SOUZA, D.H.; OWNBY, C.L. Analysis of a cDNA sequence encoding a novel member of the snake venom metalloproteinase, disintegrin-like, cysteine-rich (MDC) protein family from *Agkistrodon contortrix laticinctus*. **Biochim Biophys Acta**, v.1342 (2), p.109-15, 1997.

SELISTRE, H.S.; GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Toxicon**, v.25 (11), p.1135-44, 1987.

SELISTRE, H.S.; QUEIROZ, L.S.; CUNHA, O.A., et al. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v.28 (3), p.261-73, 1990.

SENGER, D.R.; CONNOLLY, D.T.; VAN DE WATER, L., et al. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. **Cancer Res**, v.50 (6), p.1774-8, 1990.

SENGER, D.R.; GALLI, S.J.; DVORAK, A.M., et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science**, v.219 (4587), p.983-5, 1983.

SENN, H.; KLAUS, W. The nuclear magnetic resonance solution structure of flavoridin, an antagonist of the platelet GP IIb-IIIa receptor. **J Mol Biol**, v.232 (3), p.907-25, 1993.

SERINI, G.; VALDEMBRI, D.; BUSSOLINO, F. Integrins and angiogenesis: a sticky business. **Exp Cell Res**, v.312 (5), p.651-8, 2006.

SERRANO, S.M.; JIA, L.G.; WANG, D., et al. Function of the cysteine-rich domain of the haemorrhagic metalloproteinase atrolysin A: targeting adhesion proteins collagen I and von Willebrand factor. **Biochem J**, v.391 (Pt 1), p.69-76, 2005.

SERRANO, S.M.; KIM, J.; WANG, D., et al. The cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor A domains: role in substrate targeting. **J Biol Chem**, v.281 (52), p.39746-56, 2006.

SERRANO, S.M.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C.A., et al. Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v.34 (21), p.7186-93, 1995.

SERRANO, S.M.; WANG, D.; SHANNON, J.D., et al. Interaction of the cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases with the A1 domain of von Willebrand factor promotes site-specific proteolysis of von Willebrand factor and inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet aggregation. **FEBS J**, v.274 (14), p.3611-21, 2007.

SHAH, N.K.; REJTO, P.A.; VERKHIVKER, G.M. Structural consensus in ligand-protein docking identifies recognition peptide motifs that bind streptavidin. **Proteins**, v.28 (3), p.421-33, 1997.

SHALABY, F.; ROSSANT, J.; YAMAGUCHI, T.P., et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. **Nature**, v.376 (6535), p.62-6, 1995.

SHATTIL, S.J.; GINSBERG, M.H. Integrin signaling in vascular biology. **J Clin Invest**, v.100 (11 Suppl), p.S91-5, 1997.

SHATTIL, S.J.; KASHIWAGI, H.; PAMPORI, N. Integrin signaling: the platelet paradigm. **Blood**, v.91 (8), p.2645-57, 1998.

SHEU, J.R.; LIN, C.H.; CHUNG, J.L., et al. Triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing antiplatelet peptide inhibits cell-substratum adhesion and melanoma cell-induced lung colonization. **Jpn J Cancer Res**, v.83 (8), p.885-93, 1992.

SHEU, J.R.; LIN, C.H.; HUANG, T.F. Triflavin, an antiplatelet peptide, inhibits tumor cell-extracellular matrix adhesion through an arginine-glycine-aspartic acid-dependent mechanism. **J Lab Clin Med**, v.123 (2), p.256-63, 1994.

SHEU, J.R.; YEN, M.H.; KAN, Y.C., et al. Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti-alpha(v)beta3 integrin monoclonal antibody. **Biochim Biophys Acta**, v.1336 (3), p.445-54, 1997.

SHIBUYA, M.; CLAESSION-WELSH, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Exp Cell Res**, v.312 (5), p.549-60, 2006.

SHIMOKAWA, K.; SHANNON, J.D.; JIA, L.G., et al. Sequence and biological activity of catrocollastatin-C: a disintegrin-like/cysteine-rich two-domain protein from *Crotalus atrox* venom. **Arch Biochem Biophys**, v.343 (1), p.35-43, 1997.

SHORT, S.M.; TALBOTT, G.A.; JULIANO, R.L. Integrin-mediated signaling events in human endothelial cells. **Mol Biol Cell**, v.9 (8), p.1969-80, 1998.

SIEG, D.J.; HAUCK, C.R.; ILIC, D., et al. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. **Nat Cell Biol**, v.2 (5), p.249-56, 2000.

SIMONS, M.; BONOW, R.O.; CHRONOS, N.A., et al. Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary. **Circulation**, v.102 (11), p.E73-86, 2000.

SINGH, J.; ITAHANA, Y.; KNIGHT-KRAJEWSKI, S., et al. Proteolytic enzymes and altered glycosylation modulate dystroglycan function in carcinoma cells. **Cancer Res**, v.64 (17), p.6152-9, 2004.

SMITH, J.B.; THEAKSTON, R.D.; COELHO, A.L., et al. Characterization of a monomeric disintegrin, ocellatusin, present in the venom of the Nigerian carpet viper, *Echis ocellatus*. **FEBS Lett**, v.512 (1-3), p.111-5, 2002.

SMITH, K.J.; JASEJA, M.; LU, X., et al. Three-dimensional structure of the RGD-containing snake toxin albolabrin in solution, based on 1H NMR spectroscopy and simulated annealing calculations. **Int J Pept Protein Res**, v.48 (3), p.220-8, 1996.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T., et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem**, v.150 (1), p.76-85, 1985.

SOKER, S.; GOLLAMUDI-PAYNE, S.; FIDDER, H., et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF165. **J Biol Chem**, v.272 (50), p.31582-8, 1997.

SOUZA, D.H.; IEMMA, M.R.; FERREIRA, L.L., et al. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. **Arch Biochem Biophys**, v.384 (2), p.341-50, 2000.

SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, v.76 (2), p.301-14, 1994.

SRIRAMARAO, P.; STEFFNER, P.; GEHLSSEN, K.R. Biochemical evidence for a homophilic interaction of the alpha 3 beta 1 integrin. **J Biol Chem**, v.268 (29), p.22036-41, 1993.

STAIANO, N.; VILLANI, G.R.; DI MARTINO, E., et al. Echistatin inhibits the adhesion of murine melanoma cells to extracellular matrix components. **Biochem Mol Biol Int**, v.35 (1), p.11-9, 1995.

SUHR, S.M.; KIM, D.S. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**, v.224 (1), p.134-9, 1996.

SWENSON, S.; COSTA, F.; MINEA, R., et al. Intravenous liposomal delivery of the snake venom disintegrin contortrostatin limits breast cancer progression. **Mol Cancer Ther**, v.3 (4), p.499-511, 2004.

SYMINGTON, B.E.; TAKADA, Y.; CARTER, W.G. Interaction of integrins alpha 3 beta 1 and alpha 2 beta 1: potential role in keratinocyte intercellular adhesion. **J Cell Biol**, v.120 (2), p.523-35, 1993.

TAKADA, Y.; YE, X.; SIMON, S. The integrins. **Genome Biol**, v.8 (5), p.215, 2007.

TAKAGI, J.; SPRINGER, T.A. Integrin activation and structural rearrangement. **Immunol Rev**, v.186 p.141-63, 2002.

TAKAHASHI, H.; SHIBUYA, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. **Clin Sci (Lond)**, v.109 (3), p.227-41, 2005.

TAKAHASHI, T.; YAMAGUCHI, S.; CHIDA, K., et al. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. **EMBO J**, v.20 (11), p.2768-78, 2001.

TAKEICHI, M.; NAKAGAWA, S.; AONO, S., et al. Patterning of cell assemblies regulated by adhesion receptors of the cadherin superfamily. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.355 (1399), p.885-90, 2000.

TARUI, T.; AKAKURA, N.; MAJUMDAR, M., et al. Direct interaction of the kringle domain of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and integrin alpha v beta 3 induces signal transduction and enhances plasminogen activation. **Thromb Haemost**, v.95 (3), p.524-34, 2006.

TARUI, T.; MAZAR, A.P.; CINES, D.B., et al. Urokinase-type plasminogen activator receptor (CD87) is a ligand for integrins and mediates cell-cell interaction. **J Biol Chem**, v.276 (6), p.3983-90, 2001.

TARUI, T.; MILES, L.A.; TAKADA, Y. Specific interaction of angiostatin with integrin alpha(v)beta(3) in endothelial cells. **J Biol Chem**, v.276 (43), p.39562-8, 2001.

TAVERNA, D.; CROWLEY, D.; CONNOLLY, M., et al. A direct test of potential roles for beta3 and beta5 integrins in growth and metastasis of murine mammary carcinomas. **Cancer Res**, v.65 (22), p.10324-9, 2005.

TAWIL, N.J.; GOWRI, V.; DJONEIDI, M., et al. Integrin alpha3beta1 can promote adhesion and spreading of metastatic breast carcinoma cells on the lymph node stroma. **Int J Cancer**, v.66 (5), p.703-10, 1996.

TERMAN, B.I.; CARRION, M.E.; KOVACS, E., et al. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. **Oncogene**, v.6 (9), p.1677-83, 1991.

TERRUGGI, C.H.B., COMINETTI, M. R., BÉRARD, M., CRÉPIN, M., SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. (2006). The disintegrin Alternagin-C modulates migration and viability of breast tumor cells. Toxines et cancer (Coll. Rencontres en toxicologie). LAVOISIER. **1**: 201-208.

THOMAS, K.A.; RIOS-CANDELORE, M.; GIMENEZ-GALLEGO, G., et al. Pure brain-derived acidic fibroblast growth factor is a potent angiogenic vascular endothelial cell mitogen with sequence homology to interleukin 1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.82 (19), p.6409-13, 1985.

THOUMINE, O.; NEREM, R.M.; GIRARD, P.R. Changes in organization and composition of the extracellular matrix underlying cultured endothelial cells exposed to laminar steady shear stress. **Lab Invest**, v.73 (4), p.565-76, 1995.

TONINI, T.; ROSSI, F.; CLAUDIO, P.P. Molecular basis of angiogenesis and cancer. **Oncogene**, v.22 (42), p.6549-56, 2003.

TOOMBS, C.F. Alfineprase: pharmacology of a novel fibrinolytic metalloproteinase for thrombolysis. **Haemostasis**, v.31 (3-6), p.141-7, 2001.

TRIKHA, M.; DE CLERCK, Y.A.; MARKLAND, F.S. Contortrostatin, a snake venom disintegrin, inhibits beta 1 integrin-mediated human metastatic melanoma cell adhesion and blocks experimental metastasis. **Cancer Res**, v.54 (18), p.4993-8, 1994.

TRIKHA, M.; SCHMITMEIER, S.; MARKLAND, F.S. Purification and characterization of fibrolase isoforms from venom of individual southern copperhead (*Agkistrodon contortrix* Contortrix) snakes. **Toxicon**, v.32 (12), p.1521-31, 1994.

TUCKWELL, D.S.; HUMPHRIES, M.J. A structure prediction for the ligand-binding region of the integrin beta subunit: evidence for the presence of a von Willebrand factor A domain. **FEBS Lett**, v.400 (3), p.297-303, 1997.

TUCKWELL, D.S.; REID, K.B.; BARNES, M.J., et al. The A-domain of integrin alpha 2 binds specifically to a range of collagens but is not a general receptor for the collagenous motif. **Eur J Biochem**, v.241 (3), p.732-9, 1996.

TULLA, M.; PENTIKAINEN, O.T.; VIITASALO, T., et al. Selective binding of collagen subtypes by integrin alpha 1I, alpha 2I, and alpha 10I domains. **J Biol Chem**, v.276 (51), p.48206-12, 2001.

USAMI, Y.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S., et al. A 28 kDa-protein with disintegrin-like structure (jararhagin-C) purified from Bothrops jararaca venom inhibits collagen- and ADP-induced platelet aggregation. **Biochem Biophys Res Commun**, v.201 (1), p.331-9, 1994.

VAN DER FLIER, A.; SONNENBERG, A. Function and interactions of integrins. **Cell Tissue Res**, v.305 (3), p.285-98, 2001.

VAN DER, P.; VLOEDGRAVEN, H.; PAPAPOULOS, S., et al. Attachment characteristics and involvement of integrins in adhesion of breast cancer cell lines to extracellular bone matrix components. **Lab Invest**, v.77 (6), p.665-75, 1997.

VANDENBERG, P.; KERN, A.; RIES, A., et al. Characterization of a type IV collagen major cell binding site with affinity to the alpha 1 beta 1 and the alpha 2 beta 1 integrins. **J Cell Biol**, v.113 (6), p.1475-83, 1991.

VANHOUTTE, P.M.; HOUSTON, D.S. Platelets, endothelium, and vasospasm. **Circulation**, v.72 (4), p.728-34, 1985.

VELLING, T.; KUSCHE-GULLBERG, M.; SEJERSEN, T., et al. cDNA cloning and chromosomal localization of human alpha(11) integrin. A collagen-binding, I domain-containing, beta(1)-associated integrin alpha-chain present in muscle tissues. **J Biol Chem**, v.274 (36), p.25735-42, 1999.

VINOGRADOVA, O.; VELYVIS, A.; VELYVIENE, A., et al. A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. **Cell**, v.110 (5), p.587-97, 2002.

VLAHAKIS, N.E.; YOUNG, B.A.; ATAKILIT, A., et al. The lymphangiogenic vascular endothelial growth factors VEGF-C and -D are ligands for the integrin alpha9beta1. **J Biol Chem**, v.280 (6), p.4544-52, 2005.

VONLAUFEN, A.; WIEDLE, G.; BORISCH, B., et al. Integrin alpha(v)beta(3) expression in colon carcinoma correlates with survival. **Mod Pathol**, v.14 (11), p.1126-32, 2001.

WAGNER, G.; WYSS, D.F. Cell surface adhesion receptors. **Curr Opin Struct Biol**, v.4 (6), p.841-51, 1994.

WALENTA, S.; SCHROEDER, T.; MUELLER-KLIESER, W. Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology. **Curr Med Chem**, v.11 (16), p.2195-204, 2004.

WALTENBERGER, J.; CLAEISSON-WELSH, L.; SIEGBAHN, A., et al. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. **J Biol Chem**, v.269 (43), p.26988-95, 1994.

WANG, F.; HANSEN, R.K.; RADISKY, D., et al. Phenotypic reversion or death of cancer cells by altering signaling pathways in three-dimensional contexts. **J Natl Cancer Inst**, v.94 (19), p.1494-503, 2002.

WANG, H.; KEISER, J.A. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1. **Circ Res**, v.83 (8), p.832-40, 1998.

WARSHAWSKY, H.; HADDAD, A.; GONCALVES, R.P., et al. Fine structure of the venom gland epithelium of the South American rattlesnake and radioautographic studies of protein formation by the secretory cells. **Am J Anat**, v.138 (1), p.79-119, 1973.

WARY, K.K.; MARIOTTI, A.; ZURZOLO, C., et al. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. **Cell**, v.94 (5), p.625-34, 1998.

WEAVER, V.M.; PETERSEN, O.W.; WANG, F., et al. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. **J Cell Biol**, v.137 (1), p.231-45, 1997.

WEGENER, K.L.; PARTRIDGE, A.W.; HAN, J., et al. Structural basis of integrin activation by talin. **Cell**, v.128 (1), p.171-82, 2007.

WEISS, L. Metastatic inefficiency. **Adv Cancer Res**, v.54 p.159-211, 1990.

WHITE, D.E.; KURPIOS, N.A.; ZUO, D., et al. Targeted disruption of beta1-integrin in a transgenic mouse model of human breast cancer reveals an essential role in mammary tumor induction. **Cancer Cell**, v.6 (2), p.159-70, 2004.

WHITTAKER, C.A.; HYNES, R.O. Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. **Mol Biol Cell**, v.13 (10), p.3369-87, 2002.

WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I.; NIEWIAROWSKI, S.; MARCINKIEWICZ, C., et al. Structural requirements of echistatin for the recognition of alpha(v)beta(3) and alpha(5)beta(1) integrins. **J Biol Chem**, v.274 (53), p.37809-14, 1999.

XIONG, J.P.; STEHLE, T.; DIEFENBACH, B., et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. **Science**, v.294 (5541), p.339-45, 2001.

XIONG, J.P.; STEHLE, T.; GOODMAN, S.L., et al. Integrins, cations and ligands: making the connection. **J Thromb Haemost**, v.1 (7), p.1642-54, 2003.

YAHALOM, D.; WITTELSBERGER, A.; MIERKE, D.F., et al. Identification of the principal binding site for RGD-containing ligands in the alpha(V)beta(3) integrin: a photoaffinity cross-linking study. **Biochemistry**, v.41 (26), p.8321-31, 2002.

YAMADA, D.; SHIN, Y.; MORITA, T. Nucleotide sequence of a cDNA encoding a common precursor of disintegrin flavostatin and hemorrhagic factor HR2a from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. **FEBS Lett**, v.451 (3), p.299-302, 1999.

YANCOPOULOS, G.D.; DAVIS, S.; GALE, N.W., et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**, v.407 (6801), p.242-8, 2000.

YEH, C.H.; PENG, H.C.; HUANG, T.F. Accutin, a new disintegrin, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo by acting as integrin $\alpha v \beta 3$ antagonist and inducing apoptosis. **Blood**, v.92 (9), p.3268-76, 1998.

YEH, C.H.; PENG, H.C.; YANG, R.S., et al. Rhodostomin, a snake venom disintegrin, inhibits angiogenesis elicited by basic fibroblast growth factor and suppresses tumor growth by a selective $\alpha(v)\beta(3)$ blockade of endothelial cells. **Mol Pharmacol**, v.59 (5), p.1333-42, 2001.

YONEDA, T.; WILLIAMS, P.J.; HIRAGA, T., et al. A bone-seeking clone exhibits different biological properties from the MDA-MB-231 parental human breast cancer cells and a brain-seeking clone in vivo and in vitro. **J Bone Miner Res**, v.16 (8), p.1486-95, 2001.

ZACHARY, I.; ROZENGURT, E. Focal adhesion kinase (p125FAK): a point of convergence in the action of neuropeptides, integrins, and oncogenes. **Cell**, v.71 (6), p.891-4, 1992.

ZAIDEL-BAR, R.; ITZKOVITZ, S.; MA'AYAN, A., et al. Functional atlas of the integrin adhesome. **Nat Cell Biol**, v.9 (8), p.858-67, 2007.

ZAMIR, E.; GEIGER, B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. **J Cell Sci**, v.114 (Pt 20), p.3583-90, 2001.

ZETTER, B.R. The cellular basis of site-specific tumor metastasis. **N Engl J Med**, v.322 (9), p.605-12, 1990.

ZHANG, W.M.; KAPYLA, J.; PURANEN, J.S., et al. $\alpha 11 \beta 1$ integrin recognizes the GFOGER sequence in interstitial collagens. **J Biol Chem**, v.278 (9), p.7270-7, 2003.

ZHAO, Q.; EGASHIRA, K.; HIASA, K., et al. Essential role of vascular endothelial growth factor and Flt-1 signals in neointimal formation after periadventitial injury. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.24 (12), p.2284-9, 2004.

ZHOU, Q.; NAKADA, M.T.; ARNOLD, C., et al. Contortrostatin, a dimeric disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix*, inhibits angiogenesis. **Angiogenesis**, v.3 (3), p.259-69, 1999.

ZHOU, Q.; NAKADA, M.T.; BROOKS, P.C., et al. Contortrostatin, a homodimeric disintegrin, binds to integrin $\alpha v \beta 5$. **Biochem Biophys Res Commun**, v.267 (1), p.350-5, 2000.

ZHOU, Q.; SHERWIN, R.P.; PARRISH, C., et al. Contortrostatin, a dimeric disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix*, inhibits breast cancer progression. **Breast Cancer Res Treat**, v.61 (3), p.249-60, 2000.

ZHOU, Q.; SMITH, J.B.; GROSSMAN, M.H. Molecular cloning and expression of catrocollastatin, a snake-venom protein from *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake) which inhibits platelet adhesion to collagen. **Biochem J**, v.307 (Pt 2) p.411-7, 1995.

ZHU, S.; GLADSON, C.L.; WHITE, K.E., et al. Urokinase receptor mediates lung fibroblast attachment and migration toward provisional matrix proteins through interaction with multiple integrins. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.297 (1), p.L97-108, 2009.

ZHU, Z.; SANCHEZ-SWEATMAN, O.; HUANG, X., et al. Anoikis and metastatic potential of cloudman S91 melanoma cells. **Cancer Res**, v.61 (4), p.1707-16, 2001.

ZUTTER, M.M.; SANTORO, S.A.; STAATZ, W.D., et al. Re-expression of the alpha 2 beta 1 integrin abrogates the malignant phenotype of breast carcinoma cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.92 (16), p.7411-5, 1995.