

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

O EFEITO DA DESINTEGRINA DisBa-01 E DO SILENCIAMENTO DA  
INTEGRINA  $\alpha_v\beta_3$  E NA INTERAÇÃO DE CELULAS TUMORAIS E  
ENDOTELIAIS *in vitro*

ARACELI CRISTINA DURANTE

SÃO CARLOS

2013

O EFEITO DA DESINTEGRINA DisBa-01 E DO SILENCIAMENTO DA  
INTEGRINA  $\alpha_v\beta_3$  E NA INTERAÇÃO DE CELULAS TUMORAIS E  
ENDOTELIAIS *in vitro*

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

O EFEITO DA DESINTEGRINA DisBa-01 E DO SILENCIAMENTO DA  
INTEGRINA  $\alpha_v\beta_3$  E NA INTERAÇÃO DE CELULAS TUMORAIS E  
ENDOTELIAIS *in vitro*

ARACELI CRISTINA DURANTE

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Genética Evolutiva  
e Biologia Molecular do Centro de  
Ciências Biológicas e da Saúde da  
Universidade Federal de São  
Carlos, como parte dos requisitos  
para obtenção do título de mestre  
em Genética Evolutiva e Biologia  
Molecular.

SÃO CARLOS

2013

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

D951ed Durante, Araceli Cristina.  
O efeito da desintegrina DisBa-01 e do silenciamento da integrina  $\alpha_v\beta_3$  e na interação de células tumorais e endoteliais *in vitro* / Araceli Cristina Durante. -- São Carlos : UFSCar, 2013.  
93 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Biologia molecular. 2. Desintegrina. 3. Integrina. 4. RNA interferente. 5. Genética. I. Título.

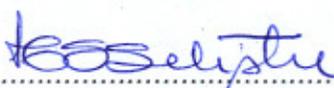
CDD: 574.88 (20<sup>a</sup>)

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

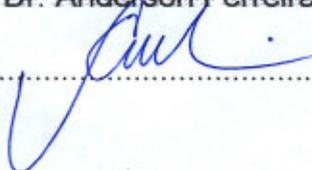
Dissertação de Mestrado de  
**ARACELI CRISTINA DURANTE**

**Banca Examinadora**

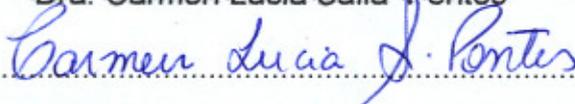
Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

  
.....

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

  
.....

Dra. Carmen Lúcia Salla Pontes

  
.....

Dedico este trabalho aos meus pais Maria Regina  
Guaiume Grigoletto Durante e Mauro Durante e ao meu  
irmão, Mauro Durante Junior, pelo incentivo, apoio e fé.  
Amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família que sempre me deu forças, apoio, amor e permitiu que eu me dedicasse à pós-graduação.

Agradeço à Profa. Dra. Heloísa, por ter me aceito inicialmente na fase de graduação para me iniciar nos caminhos da pesquisa e, depois, na pós-graduação, acreditando em mim. Pelo incentivo ao crescimento profissional, paciência e confiança.

Agradeço à Carmen Lúcia, que me ensinou muito durante a graduação, em que fui sua “escravinha”. Obrigada por ter acreditado em mim e paciência em me ensinar, não só na parte acadêmica, mas por todo o restante, sempre.

Agradeço à Kelli Maria, que me pegou pela mão e me ensinou a desenvolver toda a pesquisa envolvida no projeto. Obrigada pelo exemplo de força, dedicação e perseverança. Pela paciência, fé e amizade.

Agradeço à Flávia Zandonadi da Silva (Frávia), que sempre esteve por perto para ouvir, falar, incentivar e rir muito comigo durante todo o período em que estive em São Carlos, desde a graduação, enfrentando todos os obstáculos. Agradeço à Thaila Quatrini Corrêa, pela amizade também desde a graduação, enfrentando junto, todos os obstáculos. Agradeço, também, à Carol Carnielli, que se tornou uma grande amiga e companheira de malhação.

Agradeço à Lívia Mara Santos, à Camila Gatto, à Fernanda Duarte, ao Vinícius Azevedo, à Graziéle Deriggi, por estarem sempre presentes durante todo o período, me ouvir, me ajudar e me incentivar, por rir comigo e terem compartilhado um pouquinho da vida de vocês comigo.

Agradeço aos demais alunos e agregados ao laboratório: Rita, Adriana, Guilherme Sazon, Vinicius, Marcelo, Uliana, Zé Neto, Antonio, Natália, Giselle, Cyntia, Carol, Carol Bellani, Patty, Rafael, Tamires, Guilherme, Leo, com os quais convivi e aprendi durante este período.

Agradeço aos integrantes do laboratório: Bete, Natália e Zé Roberto, pela ajuda do dia-a-dia, pois são pequenas coisas que nos ajudam no desenvolvimento dos experimentos.

Agradeço ao Prof. Dr. Hernandes F. Carvalho, por ter disponibilizado o seu laboratório e permitido usufruir da estrutura e recursos do seu laboratório.

Agradeço ao Dr. Edward Shaw e à Dra. Charlotte L. Ownby e sua família, que esteve sempre preocupada comigo durante minha estadia em Stillwater e por terem me aceito em seus laboratórios da OSU, me proporcionando um período de muito aprendizado profissional e pessoal.

Agradeço aos alunos dos demais laboratórios em que estive, no Brasil e nos Estados Unidos. Obrigada pelo apoio, pelo incentivo e pela companhia em todos os momentos.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular e suas funcionárias, principalmente à Ivanildes, que sempre estiveram dispostas e me ajudaram muito.

E, finalmente, agradeço à CAPES, CNPq e FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos, apoio financeiro e todas as pessoas que participaram de mais esta etapa.

Obrigada!

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.” (Albert Einstein)*

*“Os únicos limites das nossas realizações de amanhã são as nossas dúvidas e hesitações de hoje” (Franklin Roosevelt)*

*“Nós somos do tecido de que são feitos os sonhos.” (William Sheakespeare)*

## RESUMO

A metástase depende de uma série de processos celulares tais como adesão celular, migração transendotelial e proliferação em um novo sítio. Esses eventos são mediados principalmente por integrinas, que são receptores de adesão presentes na superfície celular, responsáveis pela ligação entre a célula e a matriz extracelular. Desintegrinas são pequenas proteínas provenientes de venenos de serpentes, conhecidas por inibir a ação de integrinas e, conseqüentemente, inibem eventos inerentes à cascata metastática como a migração transendotelial. A DisBa-01 é uma desintegrina recombinante com motivo adesivo RGD, proveniente do veneno de *Rhinocerophis alternatus*, que possui afinidade pela integrina  $\alpha_v\beta_3$  e atividade anti-metastática *in vivo*. Assim, este trabalho teve como objetivos estudar o efeito da integrina  $\alpha_v\beta_3$  na migração transendotelial e na adesão de células tumorais da linhagem MDA-MB-231 em células endoteliais (HMEC-1), sob condição de fluxo pela utilização da DisBa-01 como antagonista deste receptor. Foram realizados ensaios de silenciamento gênico com 5nM de siRNA/ITGB3 e lipofectamina 2000 (Invitrogen) como agente transfectante. Também foram realizados ensaios de adesão celular sob condição de fluxo, migração transendotelial e interação através de *time lapse* com células tumorais da linhagem MDA-MB-231 (silenciadas ou não) tratadas com DisBa-01 nas concentrações de 10, 100, 500 e 1000nM. O silenciamento da integrina  $\beta_3$ , assim o tratamento com DisBa-01 nas concentrações de 500 e 1000nM, inibiu a adesão das células MDA-MB-231 às HMEC-1, sob condição de fluxo e a migração transendotelial. A interação entre a DisBa-01 e as células tumorais foi visualizada somente com células não silenciadas e tratadas com 1000nM de desintegrina. Assim, é importante a utilização da DisBa-01 em diferentes linhagens celulares e modelos *in vivo* para melhor elucidção dos seus efeitos como possível droga anti-metastática.

## ABSTRACT

Metastasis depends on several physiological processes such as cell adhesion, transendothelial cell migration and proliferation. These events are mediated mostly by integrins, which are adhesion receptors present on cell surface and responsible for cell-extracellular matrix (ECM) binding. Disintegrins are small proteins from snake venoms, known to inhibit integrin action and therefore metastatic events such as transendothelial cell migration. DisBa-01 is a recombinant RGD disintegrin from *Rhinoceraphis alternatus* venom gland, with high affinity to the  $\alpha_v\beta_3$  integrin and anti-metastatic activity *in vivo*. Thereby, the aim of this work was to investigate the effect of  $\alpha_v\beta_3$  integrin in cell transendothelial migration and cell adhesion under flow of MDA-MB-231 tumor cell line using DisBa-01 as  $\alpha_v\beta_3$  integrin antagonist. The  $\beta_3$  subunit was knockdown by 1 $\mu$ L siRNA/ITGB3 and lipofectamine 2000 (Invitrogen) was used as transfection agent. Additionally cell adhesion under flow, transendothelial migration and time lapse assays were performed using MDA-MB-231 cell line (silenced or not) incubated with 10, 100, 500 and 1000nM of DisBa-01. The  $\beta_3$  integrin knockdown and treatments with DisBa-01 at 500 and 1000nM significantly inhibited cell adhesion as well as the transendothelial migration. The interaction between DisBa-01 and tumor cells was visualized only with 1000nM of disintegrin and not silenced cells. Therefore, it is important using DisBa-01 in different cell lines and *in vivo* to elucidate more aspects of its effects as anti-metastatic drug.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

BSA – Soro Albumina Bovina

cDNA – Ácido desoxirribonucléico complementar

CDC42 – GTPase da família Rho

Da – Dáltons

DAPI – Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole

D/ECD – Sequência adesiva formada pelos resíduos de aminoácidos ácido aspártico/ácido glutâmico – cisteína – ácido aspártico

DisBa-01 – Desintegrina *Bothrops alternatus* 01

DMEM – Meio Dulbelco's modificado

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

D.O. – Densidade Óptica

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético

EGF – Fator de crescimento epitelial

EILDV – Sequência adesiva formada por ácido glutâmico - isoleucina - leucina - ácido aspártico - valina

ERM – ezrina, radixinina, moesina

FAK – Quinase de adesão focal

FBS – Soro fetal bovino

GAPDH – Gliceraldeído fosfato desidrogenase

GFP – Proteína Verde fluorescente

GRB2 – Proteína adaptadora

GTP – Guanidina trifosfato

GTPases – Enzimas que quebram a molécula de GTP

HMEC – Células endoteliais humanas de microvasculatura de derme

HPRT – Hipoxantina Guanina Fosforibosiltransferase

HRAS – Proteínas ligantes de GTP

ICAM – Molécula de adesão intracelular

IDG – Sequência adesiva formada por isoleucina - ácido aspártico - glicina

ILK – Proteínas do citoesqueleto (*integin – linked kinase*)

IPTG – Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

K/RGD – Sequência adesiva formada por lisina/arginina – glicina – ácido aspártico

LB – Meio de cultura líquido nutritivo para cultura de bactérias (Luria Bertani)

LOX – Lisil oxidase

MAPK – “*mitogen activated protein kinase*”

MEC – Matriz extracelular

MFP – Depósitos de gordura mamária

MIDAS – Sítio de adesão dependente de íon metal

MMP-2 – Metaloprotease 2

MMP-9 – Metaloprotease 9

mRNA – RNA mensageiro

miRNA – micro RNA

MWCO – “*molecular weight cut off*”

nm - nanômetros

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão salina fosfato

PIP2 – Fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato

PKC – proteína quinase C

RAC – Pequena proteína ligante de GTP “*small GTP-binding protein*” – GTPase da família Rho

REDV – Sequência adesiva formada por arginina – ácido glutâmico – ácido aspártico - valina

RGD – Sequência adesiva formada por arginina – glicina – ácido aspártico

RNAi – RNA de interferência

Rpm – rotações por minuto

RRAS – Proteínas ligantes de GTP

rRNA – RNA ribossômico

S100A8 – Molécula específica do nicho metastático

S100A9 – Molécula específica do nicho metastático

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (dodecil sulfato de sódio)

siRNA – RNA de silenciamento – *small interference RNA*

Src – Proteínas do citoesqueleto

SVMP – Metaloproteases de venenos de serpentes – *Snake Venom Metalloproteases*

TGF- $\beta$  – Fator de crescimento de transformação beta

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

tRNA – RNA transportador

UA – Unidade arbitrária

UERJ – Universidade Estadual do Rio de Janeiro

UTR – Região não-traduzida do mRNA

VCAM – Molécula de adesão vascular

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

VEGF-A – Fator de crescimento do endotélio vascular A

VEGFR-2 – Receptor 2 do fator de crescimento do endotélio vascular

$\mu\text{g}$  – microgramas

$\mu\text{L}$  – microlitros

mL – mililitros

mM – milimolar

nM – nanomolar

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A cascata metastática_____	18
Figura 2 – Microambiente tumoral_____	20
Figura 3 – Representação estrutural das subunidades de integrinas_____	21
Figura 4 – Domínios das subunidades $\alpha$ e $\beta$ de integrinas_____	22
Figura 5 – Dímeros de integrinas e seus receptores_____	23
Figura 6 – Conformações inativa e ativa de integrinas_____	24
Figura 7 – Ativação de integrinas através da proteína talina_____	25
Figura 8 – Regulação da função de integrinas por sinais intracelulares_____	27
Figura 9 – Cluster de integrinas e respostas celulares resultantes de cascatas de sinalização_____	28
Figura 10 – Foto de uma serpente <i>Rhinocerophis alternatus</i> _____	33
Figura 11 – Classificação de SVMPs_____	34
Figura 12 – Desintegrina de <i>Bothrops alternatus</i> (DisBa-01)_____	37
Figura 13 – Sequência de nucleotídeos dos primers para o gene da Integrina $\beta_3$ _____	48
Figura 14 – Sistema de adesão sob fluxo_____	54
Figura 15 – Representação esquemática do sistema de cultura de células sobre o inserto_____	55
Figura 16 – Representação esquemática da montagem de lâminas para visualização em microscópio das membranas dos insertos_____	56
Figura 17 – Análise da purificação da DisBa-01 por SDS-PAGE_____	58
Figura 18 – Amostras de RNA total extraído de células da linhagem MDA-MB-231_	59
Figura 19 – Representação gráfica dos valores de expressão do mRNA da subunidade $\beta_3$ em unidades arbitrárias_____	61
Figura 20 – Fotos representativas dos produtos de RT-PCR da subunidade $\beta_3$ (A) e HPRT (B) de células da linhagem MDA-MB-231_____	63
Figura 21 – Cinética do silenciamento do gene que codifica para a subunidade $\beta_3$ de integrinas em células MDA-MB-231_____	64
Figura 22 – Expressão da subunidade $\beta_3$ de integrinas e da actina extraídas de células MDA-MB-231_____	65

- Figura 23 – Efeito do silenciamento do gene codificante da subunidade b3 de integrinas sobre a adesão de células MDA-MB-231 em HMEC-1, sob condição de fluxo\_\_\_\_\_ 66
- Figura 24 – Fotos representativas da inibição da adesão de células MDA-MB-231 silenciadas em células endoteliais humanas (HMEC-1)\_\_\_\_\_ 67
- Figura 25 – Efeito da desintegrina DisBa-01, em diferentes concentrações, sobre a adesão de células MDA-MB-231 em células endoteliais humanas (HMEC-1), em condição de fluxo\_\_\_\_\_ 68
- Figura 26 – Fotos representativas do efeito da DisBa-01 na inibição da adesão de células MDA-MB-231 em células endoteliais humanas (HMEC-1)\_\_\_\_\_ 69
- Figura 27 – Efeito do silenciamento do gene codificante da subunidade b3 de integrinas sobre a transmigração de células MDA-MB-231 em células endoteliais humanas (HMEC-1)\_\_\_\_\_ 70
- Figura 28 – Fotos representativas do efeito do silenciamento do gene codificante da subunidade b3 de integrinas sobre a transmigração de células MDA-MB-231 em células endoteliais humanas (HMEC-1)\_\_\_\_\_ 70
- Figura 29 – Efeito da desintegrina DisBa-01, em diferentes concentrações, sobre a transmigração de células MDA-MB-231 em células endoteliais humanas (HMEC-1)\_\_\_\_\_ 71
- Figura 30 – Fotos representativas do efeito da DisBa-01 na inibição da transmigração de células MDA-MB-231 em células endoteliais humanas (HMEC-1)\_\_\_\_\_ 72
- Figura 31 – Fotos representativa da interação entre a desintegrina DisBa-01 com células MDA-MB-231 não silenciadas e transfectadas com GFP\_\_\_\_\_ 73
- Figura 32 – Fotos representativa da interação entre a desintegrina DisBa-01 com células MDA-MB-231\_\_\_\_\_ 74

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Classificação de desintegrinas por tamanho e número de ligações dissulfeto	35
Tabela 2 – Composição da reação de RT-qPCR	49
Tabela 3 – Parâmetros utilizados no termociclador para a reação de RT-qPCR	50
Tabela 4 – Cálculo da expressão de mRNA da subunidade $\beta_3$ obtido pela PCR em tempo real	61

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	16
1.1. Câncer.....	16
1.2. Microambiente Tumoral.....	19
1.3. Integrinas.....	21
1.3.1. Integrinas e sinalização celular.....	25
1.3.1.1. Sinalização <i>Inside-out</i> .....	26
1.3.1.2. Sinalização <i>Outside-in</i> .....	27
1.4. Integrina $\alpha_v\beta_3$ .....	29
1.5. Desintegrinas.....	32
1.6. Fluxo sanguíneo e cisalhamento.....	38
<b>2. Objetivos</b> .....	41
<b>3. Materiais e Métodos</b> .....	42
3.1. Linhagens celulares e condições de cultivo.....	42
3.2. Obtenção da desintegrina DisBa-01.....	42
3.3. SDS-PAGE ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate Poliacrylamide Gel Electrophoresis</i> ).....	43
3.4. Quantificação de proteína.....	44
3.5. Marcação de proteína com fluoróforo Alexa Fluor 555.....	44
3.6. Silenciamento de RNA (siRNA).....	45
3.6.1. Extração de RNA total.....	46
3.6.2. Gel de Agarose-formaldeído 1%.....	47
3.6.3. Primers para qPCR.....	48
3.6.4. Produção de cDNA e PCR (reação em cadeia da polimerase) quantitativo.....	49
3.6.5. Cinética do silenciamento do gene codificante para a subunidade $\beta_3$ .....	51
3.6.6. Extração de proteínas totais.....	51
3.7. <i>Western blotting</i> .....	52
3.8. Ensaio de Adesão celular sob condição de fluxo.....	53
3.9. Ensaio de Transmigração celular.....	54
3.10. Ensaio de ligação celular por <i>Time lapse</i> .....	56
3.11. Análise estatística dos dados.....	57
<b>4. Resultados</b> .....	58
4.1. Obtenção da desintegrina DisBa-01.....	58
4.2. Silenciamento de RNA (RNAi).....	59
4.2.1. Extração de RNA total.....	59
4.2.2. PCR quantitativo (RT-PCR).....	60
4.2.3. Cinética do silenciamento do gene codificante para a subunidade $\beta_3$ .....	63
4.3. <i>Western blotting</i> .....	64
4.4. Ensaio de Adesão celular sob condição de fluxo.....	65
4.5. Ensaio de Transmigração celular.....	69
4.6. Ensaio de ligação celular por <i>Time lapse</i> .....	72
<b>5. Discussão</b> .....	75
<b>6. Conclusões</b> .....	82
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	83

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Câncer

O câncer é uma doença multifatorial caracterizada pelo acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, afetando várias vias de sinalização celulares (CHIA *et al.*, 2010). Trata-se de uma das principais causas de mortes, apesar dos grandes esforços mundiais para desvendar os mecanismos celulares e moleculares que envolvem a tumorigênese (PAVELIC *et al.*, 2011). Pesquisas da Organização Mundial da Saúde (OMS) revelam um aumento do número de mortes causadas pelo câncer, com uma estimativa de 13,1 milhões de casos em 2030. Além disso, aproximadamente 70% dos casos, ocorrem nos países caracterizados como de baixa e média rendas ([www.who.int](http://www.who.int) – acesso em 17 de setembro de 2012).

O câncer se forma a partir de uma única célula, que sofre transformações em um processo com múltiplas etapas. Tipicamente ocorre uma progressão de uma lesão pré-cancerosa para um tumor maligno e estas mudanças são resultantes da interação de fatores genéticos e ambientais. Estes últimos consistem em três principais agentes: i) físicos, como a luz ultravioleta e a radiação ionizante; ii) químicos, como asbesto, componentes da fumaça do tabaco e arsênico; e iii) biológicos, como infecções por certos vírus, bactérias ou parasitas. Um outro fator importante para o desenvolvimento do câncer é a maior expressão de oncogenes, uma vez que, além de aumentarem os riscos para aquisição de certos tumores, há uma tendência de diminuição da eficácia do reparo celular durante as suas divisões (ALBERTS, *et al.*, 2008).

A progressão do câncer é um processo complexo e com muitas etapas, que inclui o crescimento tumoral, a migração, invasão, angiogênese e metástase. A angiogênese, processo de formação de novos vasos sanguíneos, é essencial permitindo o crescimento do tumor e viabilizando a metástase. Além disso, ocorrem estimulações recíprocas para a multiplicação de

células tumorais e endoteliais, mediadas pela secreção de fatores de crescimento (CAO, 2001). Em contrapartida, quando a formação de novos vasos é inibida, o volume tumoral fica restrito a um estado dormente com cerca de  $2 \text{ mm}^3$  (HOLMGREN *et al.*, 1996; ELLIS & FIDLER, 1996). Já a formação de um novo sítio tumoral envolve um processo metastático, o qual consiste em uma série de processos biológicos discretos, em que células tumorais se deslocam do tumor primário para outro tecido não-adjacente, onde se desenvolve um novo microambiente tumoral (LE *et al.*, 2010).

A presença de uma lesão metastática indica um distúrbio sistêmico mais amplo e verifica-se que mais de 90% das mortes por câncer é resultado da disseminação metastática. Esta é tratada com a extração do foco principal do câncer, seguida de radioterapia e quimioterapia, métodos de tratamentos que frequentemente não são suficientes para a cura do paciente (PAVELIC *et al.*, 2011). Entretanto, apesar dos números referentes aos tratamentos e mortes por câncer, não existe ainda uma droga efetiva contra a disseminação metastática no mercado, e poucas estão em fase de desenvolvimento experimental (clinicaltrials.gov – data de acesso 21 de setembro de 2012).

Essa dificuldade na elaboração de medicamentos que atuem inviabilizando a disseminação metastática está relacionada ao fato de que há um conhecimento limitado sobre os mecanismos moleculares envolvidos nas diversas etapas do processo metastático. Com isso, inúmeros estudos ainda estão em andamento para que sejam identificados alvos de ação e estabelecidas as bases para o desenvolvimento de drogas que consigam atuar no bloqueio dessas cascatas de eventos da disseminação metastática.

Durante este processo de disseminação metastática, pelo menos cinco etapas essenciais estão bem definidas: 1) descolamento das células do tumor primário, provocada pela perda de

moléculas de adesão, e invasão tumoral; 2) intravasamento; 3) sobrevivência na circulação sanguínea e/ou linfática, geralmente na forma de microagregados associados a plaquetas (a formação destes agregados protege as células tumorais do ataque de células NK – *natural killers* – e aumentam a resistência ao estresse de cisalhamento); 4) adesão ao endotélio seguida de extravasamento; e 5) migração, adesão e colonização em novo sítio (PERRET & CRÉPIN, 2008; ALPHONSO & ALAHARI, 2009; LAUBLI & BORSIG, 2010; LE *et al.*, 2010). Os processos migratórios são dependentes da ação de proteases capazes de degradar a matriz extracelular. Estas proteases são expressas pelas células tumorais e permitem a migração e invasão de um novo microambiente alvo. Dessa forma, as células tumorais apresentam um fenótipo diferenciado que as capacitam a interferir em seu habitat, modificando as interações célula-célula e célula-matriz extracelular, assim, viabilizando o processo metastático.

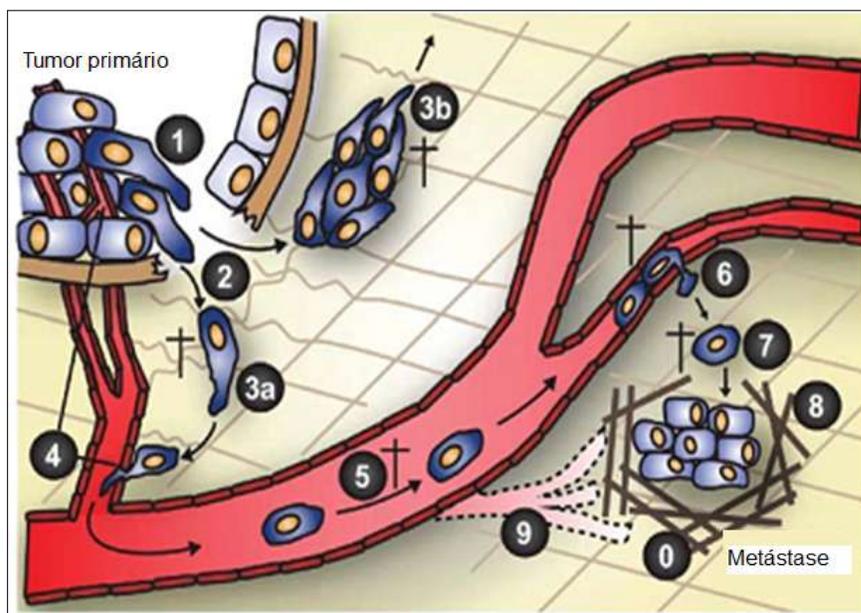


Figura 1 – A cascata metastática. 0) Nicho pré-metastático, 1) Células no sítio primário sob transição epitélio-mesenquimal e com propriedades invasivas, 2) Degradação da membrana basal e matriz extracelular (MEC), 3) Invasão celular individuais (3a) ou em grupo (3b), 4) Intravazamento de células tumorais nos vasos próximos ao tumor, 5) Células tumorais são transportadas na circulação e aderem nos capilares (6). 7) As células extravazam e proliferam no novo habitat (8). 9) Neste novo sítio, há o requerimento de angiogênese e remodelamento da MEC. Extraído e adaptado PEEPER, D. S. & GEIGER, T. R., 2009.

Este processo depende também da receptividade do sítio secundário, no qual as células tumorais se depositarão e formarão um novo foco tumoral. Este sítio secundário é denominado por alguns pesquisadores como nicho pré-metastático, pois fatores secretados pelas células tumorais do sítio primário como SDF-1, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , VEGF-A, influenciam no recrutamento de tipos celulares com elevada expressão de moléculas como fibronectina, MMP-2, MMP-9, S100A8, S100A9 e LOX. Estas por sua vez promovem o recrutamento de determinadas células tronco, as quais contribuem para a formação de um ambiente favorável para a chegada de células tumorais (PEINADO *et al.*, 2011).

## **1.2. Microambiente tumoral**

As células tumorais interagem não apenas com componentes da matriz extracelular (MEC), mas igualmente com outros elementos celulares, como fibroblastos, células do sistema imune, plaquetas e células endoteliais (ALPHONSO & ALAHARI, 2009). Dessa forma, foi desenvolvido o conceito de que os tumores são ambientes nos quais células sadias e não sadias residem e interagem ou são locais para onde essas células são recrutadas. Além disso, moléculas secretadas por ambos os tipos celulares também são constituintes importantes nos microambientes tumorais (MOHLA & WITZ, 2010). Esses componentes, somado aos materiais sólidos não celulares, como laminina, fibronectina, colágenos, dentre outras fibras da MEC, e células estromais, formam um amálgama que caracterizam o microambiente tumoral (ALPHONSO & ALAHARI, 2009).

Estudos recentes têm mostrado que o microambiente tumoral é também caracterizado pela presença de substâncias solúveis (citocinas e quimiocinas), células tronco da medula óssea, células tronco tumorais e microvesículas e/ou exossomas celulares, cujo conteúdo consiste de

proteínas, RNAs mensageiros (mRNA) e microRNAs (miRNA). Este conteúdo atua na sinalização, mediação imunológica, recrutamento celular e transferência horizontal de material genético, o que torna os exossomas um importante fator na progressão tumoral e metástase. Além disso, a ação dos exossomas nas células tronco da medula promove uma alteração no comportamento celular de tal forma que ocorre remodelamento do microambiente tumoral, além de alterações nas respostas do sistema imune (PEINADO *et al.*, 2011).

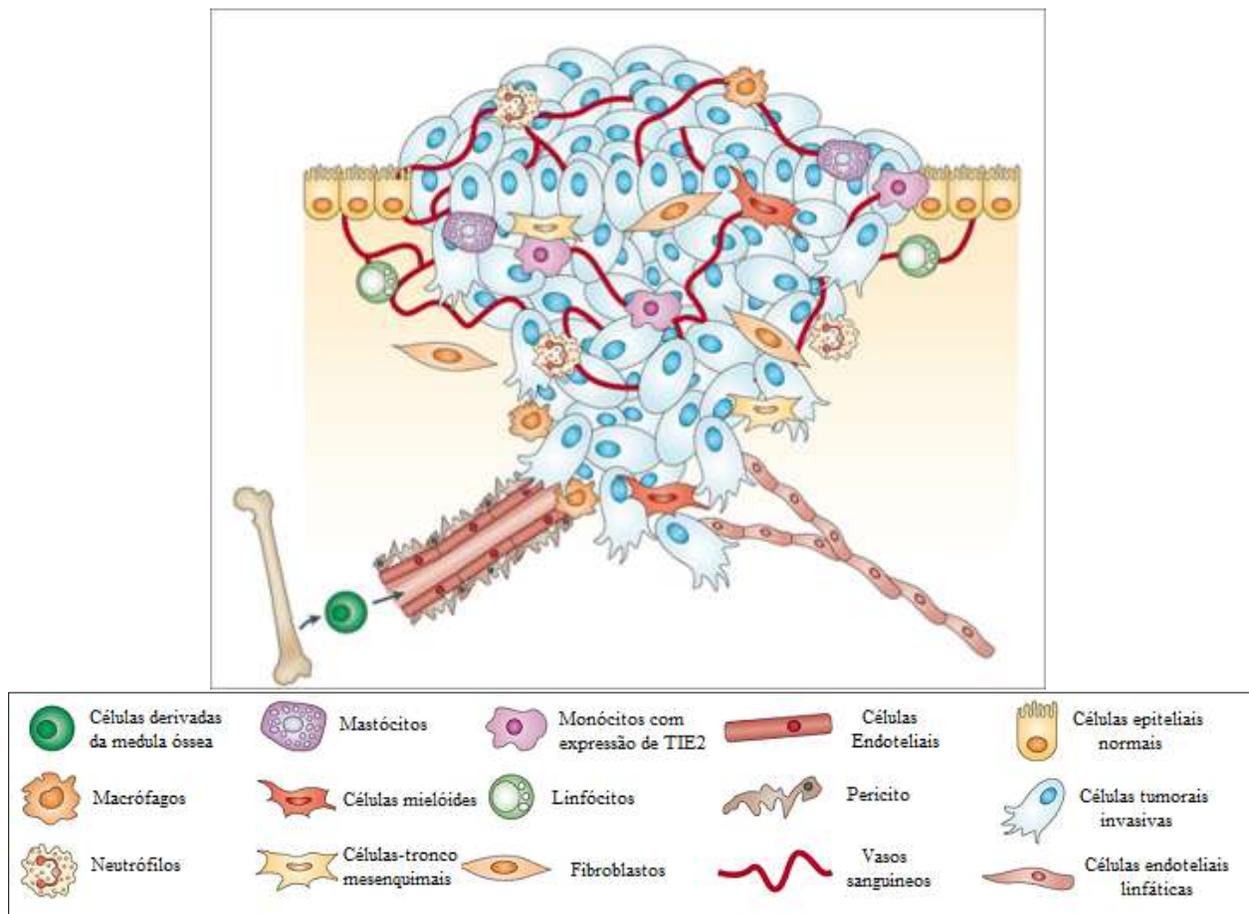


Figura 2 - Microambiente tumoral. Células tumorais, no sítio primário, cercadas por um complexo microambiente, o qual contém células endoteliais, fibroblastos e uma variedade de células tronco da medula óssea. Extraído e adaptado de JOYCE & POLLARD, 2009.

Desse modo, a disseminação metastática é um processo que envolve a comunicação celular e interações adesivas entre as células e o microambiente tumoral. Neste sentido, os

receptores de adesão, principalmente as integrinas são moléculas que exercem papéis fundamentais neste processo.

### 1.3. Integrinas

As integrinas são moléculas que, evolutivamente, são consideradas antigas, mas o estudo delas é relativamente recente (BARCZYK *et al.*, 2009). O nome integrina é proveniente da importância dessas moléculas na integridade da ligação do citoesqueleto com a MEC (HYNES, 2004). Constituem-se em receptores glicoprotéicos heterodiméricos provenientes da combinação entre subunidades  $\alpha$  (120 a 180kDa) e  $\beta$  (90 a 110kDa) através de ligação não covalente e que necessitam de cátions para a manifestação de suas atividades adesivas (PARISE *et al.*, 2000; HYNES, 2002). Cada subunidade apresenta 3 regiões: região extracelular, de glicosilação (700-900 aminoácidos); região transmembrana hidrofóbica (20-60 aminoácidos) e uma região citoplasmática envolvida em sinalização intracelular e comunicação com o citoesqueleto (HYNES, 2002)

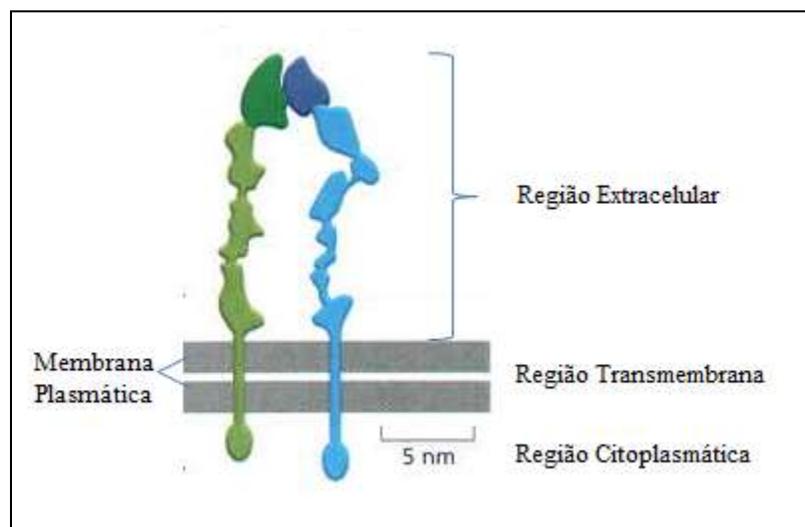


Figura 3 – Representação estrutural das subunidades de integrinas. Extraído e adaptado de ALBERTS, *et al.*, 2008.

As subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  não são homólogas entre si, entretanto as subunidades  $\alpha$  apresentam similaridades, assim como as subunidades  $\beta$  também mostram regiões conservadas em suas cadeias de peptídeos. As subunidades  $\alpha$  são constituídas de um domínio de inserção ou interação, descrito como domínio-I (com aproximadamente 200 resíduos de aminoácidos), localizado entre os domínios II e III. Nesta sequência foi encontrado um motivo *MIDAS* (sítio de adesão dependente de íon metálico), que está relacionado com a interação das integrinas aos seus respectivos ligantes (BARCZYK *et al*, 2009). Assim, a ativação das integrinas depende da ligação de cations divalentes, como  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ .

A subunidade  $\beta$  contém quatro domínios: domínio PSI (*plexin-sempahrin-integrin*), um domínio híbrido, um domínio-I *like* e uma região de quatro repetições ricas em cisteínas semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF). O domínio-I *like* da subunidade  $\beta$  contém um íon  $\text{Mg}^{2+}$  que é coordenado com o domínio *MIDAS* da subunidade  $\alpha$ .

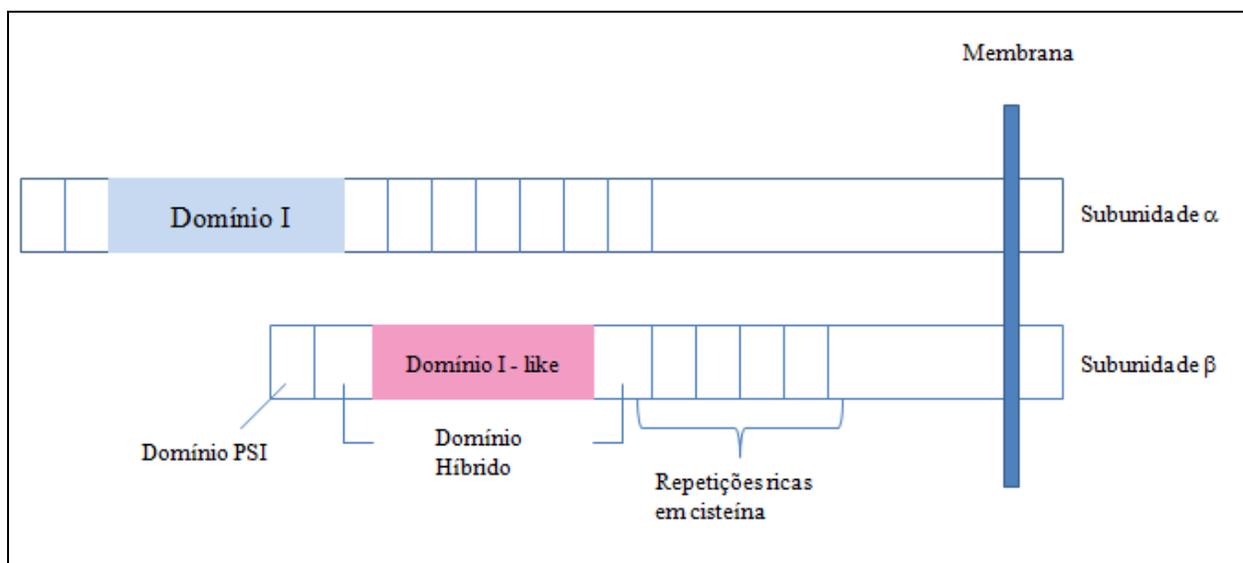


Figura 4 – Representação esquemática dos domínios das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  de integrinas. Extraído e modificado de BARCZYK *et al*, 2009.

Em humanos são conhecidas 18 subunidades  $\alpha$  e 8 subunidades  $\beta$  que se combinam para formar mais de 24 dímeros de integrinas que se expressam diferencialmente em cada tipo celular (SHIMAOKA & SPRINGER, 2003; DESGROSELLIER & CHERESH, 2010). Esses 24 heterodímeros podem ser agrupados de acordo com as propriedades de seus ligantes ou uma composição de subunidades, como mostrado na figura 5 (BARCZYK *et al.*, 2009).

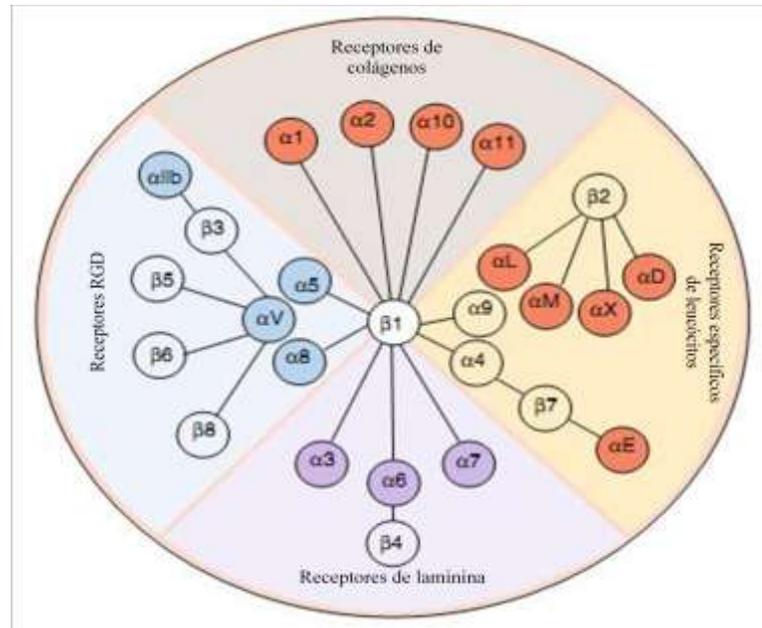


Figura 5 – Dímeros de integrinas e seus receptores. Extraído e adaptado de BRACZYK, CARRACEDO & GULLBERG, 2010.

A função das integrinas é de receptor de tração que pode tanto transmitir como detectar mudanças na força mecânica que age na matriz extracelular (TAKADA *et al.*, 2007). Também atuam na adesão célula-célula através da interação com ICAM-1, 2 e 3, VCAM-1 e caderina E (PETRUZZELLI *et al.*, 1999). Dessa forma, as integrinas proporcionam a conectividade das células e a integridade do tecido com um todo.

Essas moléculas transmembranas apresentam estados ativo ou inativo. Em sua forma inativa, as integrinas se apresentam com as caudas das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  associadas, formando um entrelaçamento entre elas (MOSER *et al.*, 2009). Nesta situação elas estão dobradas, com o

sítio ativo bloqueado, como na figura 6A. Em seu estado ativo (ou de alta afinidade), entretanto, as integrinas encontram-se em uma posição estendida e com o sítio de ligação exposto (Figura 6B).

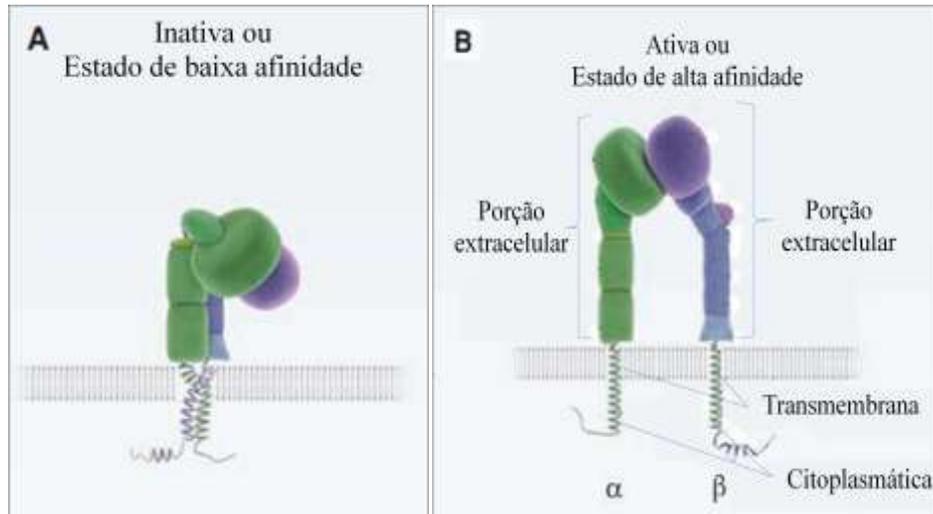


Figura 6 – Conformações inativa e ativa de integrinas. A) Integrina em estado inativo. As caudas citoplasmáticas das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  permanecem entrelaçadas e a cabeça da molécula se dobra. B) Integrina em estado de alta afinidade (ou em estado ativo). As caudas citoplasmáticas se separam e a molécula adquire uma conformação estendida, com o sítio de ligação exposto. Extraído e adaptado de MOSER et al, 2009.

A ativação pode ser realizada extra ou intracelularmente, sendo neste último caso, por sinais de receptores acoplados à proteína G que permitem a fosforilação do domínio citoplasmático da subunidade  $\beta$ . A proteína talina, uma proteína intracelular, parece apresentar um papel regulador da afinidade das integrinas. A talina, quando ativada através da sua ligação ao fosfatidil-inositol 4,5-bisfosfato ( $PIP_2$ ), torna-se estendida com seu sítio de ligação exposto, o qual se liga à porção terminal da cauda da subunidade  $\beta$ , promovendo uma mudança conformacional, e desfaz o entrelaçamento das porções citoplasmáticas das subunidades (MOSER *et al.*, 2009) Essa alteração acarreta o estiramento da porção extracelular, que aumenta a afinidade da integrina pelos seus ligantes na MEC (GINSBERG *et al.*, 2005).

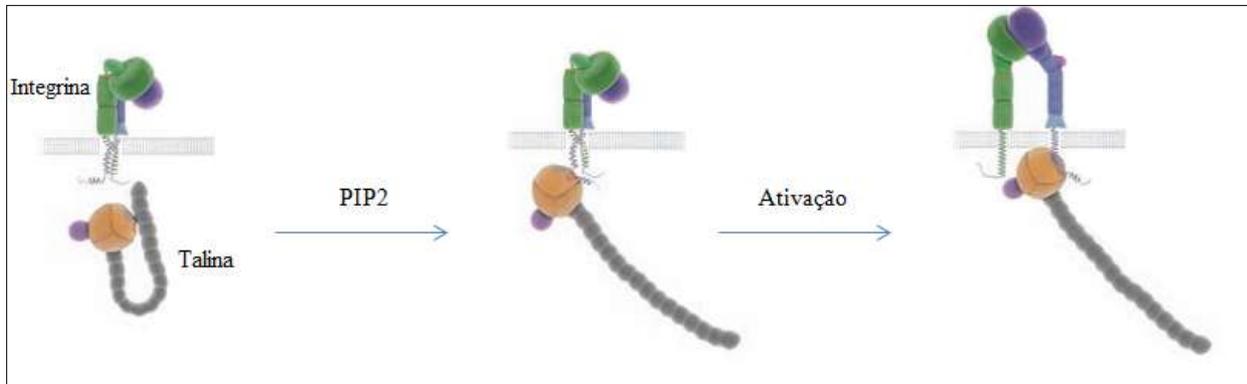


Figura 7 – Ativação de integrinas através da proteína talina. Extraído e adaptado de MOSER, *et al.*, 2009

Entretanto a simples ativação da integrina não é suficiente, pois tais moléculas não apresentam função enzimática. As integrinas realizam a transdução de sinais através de sua associação com proteínas, que as conectam com o citoesqueleto, às quinases citoplasmáticas e aos receptores transmembrana de fatores de crescimento (GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999). Essa associação resulta na determinação das respostas celulares, como sobrevivência, adesão, proliferação, migração, invasão, e proporcionam um contexto para responder a outros estímulos, incluindo os transmitidos pelos fatores de crescimento ou pelos receptores acoplados à proteína G (HARBURGER & CALDERWOOD, 2009; HOLLY *et al.*, 2000).

### 1.3.1. Integrinas e sinalização celular

Uma das funções básicas das integrinas, assim como de outros receptores de adesão, é promover uma conexão mecânica entre o citoesqueleto e a matriz extracelular, permitindo, dessa forma, a criação de uma tração durante a migração celular. Entretanto, para que as integrinas desempenhem suas funções, é essencial que ocorra uma série de eventos sinalizadores.

A sinalização das integrinas é bidirecional, isto é, pode ocorrer do meio extracelular para o intracelular (*outside-in*) e vice-versa (*inside-out*). Assim, ligações com componentes

extracelulares disparam cascatas de sinais intracelulares, ao passo que modificações intracelulares modulam a afinidades desses receptores por seus ligantes (COPPOLINO & DEDHAR, 2000). Apesar disso, a sinalização através de integrinas requer uma dinâmica temporal e espacial muito bem estabelecida e regulada para a montagem e desmontagem do arcabouço proteico que envolve o processo de ativação destes receptores (HARBURGER & CALDERWOOD, 2009).

#### **1.3.1.1.Sinalização *Inside-out***

A sinalização *inside-out* é assim denominada, pois faz referência a processos celulares em que mecanismos no interior da célula promovem alterações na afinidade das integrinas pelos seus ligantes. Além disso, este tipo de sinalização também é definido como uma série de eventos que resultam na mudança conformacional das integrinas e o agrupamento destes receptores de membrana.

As integrinas, após ativadas, desencadeiam cascatas de sinalização, iniciadas por estimulações locais intracelulares. Assim, esses receptores de membrana promovem uma transdução de sinais, através da associação com proteínas conectoras do citoesqueleto, quinases citoplasmáticas e outros receptores transmembrana de fatores de crescimento. Diferentes proteínas do lado citoplasmático da membrana, como a talina, vinculina e ERM (ezrina, radixinina, moesina), proteínas que se ligam a actina, agem como um conector do domínio citoplasmático da integrina com o citoesqueleto, resultando em interações complexas (HYNES, 2002). Dentre estas interações pode-se citar a modulação da afinidade e avidéz das integrinas. De acordo com Hood & Cheresch (2002), os mecanismos que regulam a afinidade e avidéz das integrinas variam para os diferentes heterodímeros, mas pequenas proteínas ligantes de GTP

parecem estar envolvidas. A ativação dessas pequenas proteínas ligantes de GTP (RRAS) pode aumentar a afinidade das integrinas pela MEC, enquanto que a ativação das HRAS, uma outra série de proteínas ligantes de GTP, pode causar uma diminuição dessa afinidade, ocasionando a não ligação das integrinas à MEC. De maneira semelhante, a ativação da RAC e CDC42, somado à proteína quinase C (PKC) pode resultar no agrupamento de integrinas e, conseqüentemente, no aumento da avidéz das integrinas (HOOD & CHERESH, 2002).

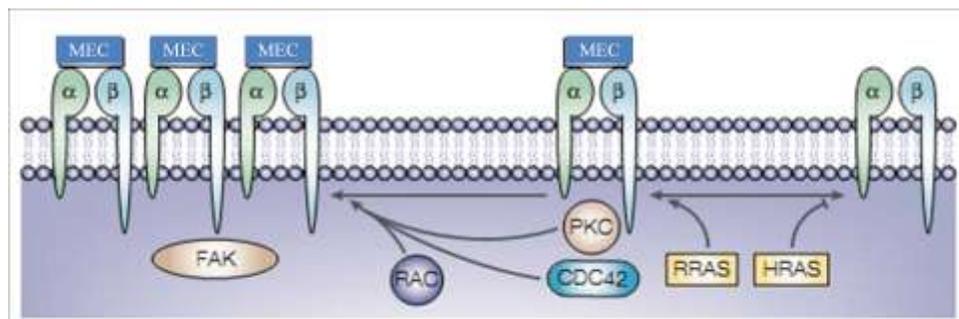


Figura 8 – Regulação da função de integrinas por sinais intracelulares. Extraído e adaptado de HOOD & CHERESH, 2002.

### 1.3.1.2. Sinalização *Outside-in*

A ligação extracelular das integrinas alavanca uma variada escala de sinais transducionais que modula o comportamento celular como a adesão, proliferação, sobrevivência ou apoptose, morfologia, polaridade, mobilidade, expressão gênica e diferenciação. A maioria desses efeitos acontece no citoesqueleto (TAKADA *et al.*, 2007).

A ligação com a MEC desencadeia um agrupamento das integrinas da superfície celular e recrutam proteínas adaptadoras, formando estruturas denominadas adesões focais. Esses complexos incluem proteínas estruturais e de sinalização, como integrinas, proteínas do citoesqueleto e quinases, dentre as quais estão: a FAK (*focal adhesion kinase*), Src, ILK, Talina, Paxilina Parvins, p130Cas e GTPases da família Rho (BERRIER & YAMADA, 2007;

HEHLGANS *et al.*, 2007). Dependendo da composição da MEC, as integrinas ativam uma ou várias vias de sinalização, as quais envolvem tipicamente a fosforilação da FAK, recrutamento de proteínas adaptadoras, ativação de GTPases e, subsequentemente, ativação *downstream* de moléculas efetoras. Esses sinais, coordenados com a sinalização proveniente dos fatores de crescimento, regulam o comportamento celular no microambiente tecidual (HOOD & CHERESH, 2002)

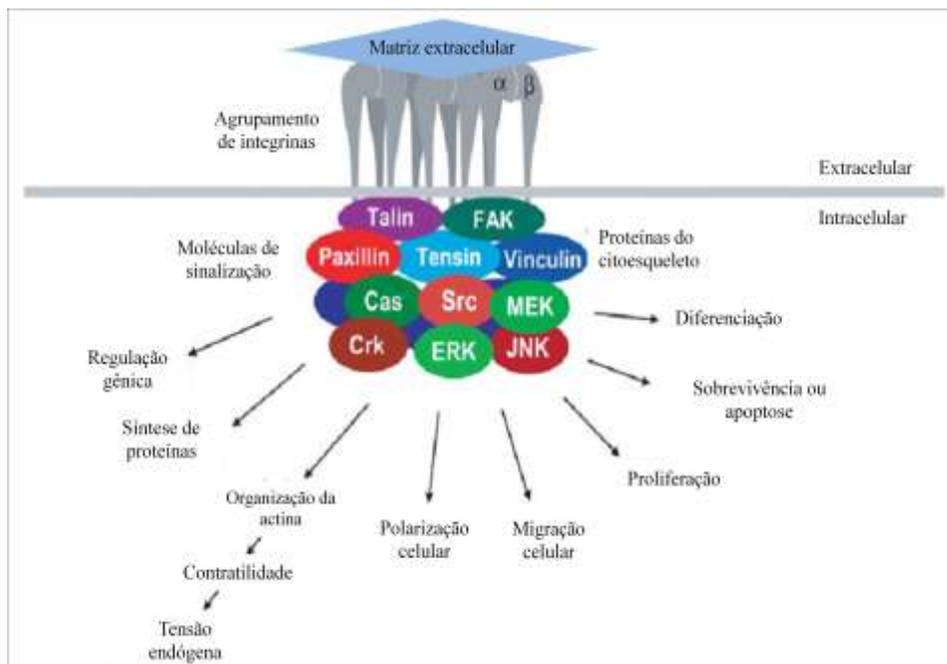


Figura 9 – Cluster de integrinas e respostas celulares resultantes de cascatas de sinalização. Extraído e adaptado de BERRIER & YAMADA, 2007.

A FAK é uma das principais moléculas a participar da sinalização mediada por integrinas e pode ser ativada pelo domínio citoplasmático da subunidade  $\beta$  da integrina ou por interações de proteínas do citoesqueleto associadas às integrinas. A regulação desta quinase não está completamente entendida. De maneira geral, com o agrupamento de integrinas, a FAK é autofosforilada e recruta quinases da família Src para as adesões focais, atuando na motilidade celular. A ligação da Src promove uma alteração conformacional na Src que a ativa e, combinada

com a FAK, há a formação de um complexo FAK-Src. Este complexo facilita a ligação da p130Cas e da proteína adaptadora GRB2. Esta ligação desencadeia a ativação da Ras e das cascatas de sinalização da ERK e MAPK (*mitogen activated protein kinase*). Por estas vias, a FAK atua na proliferação e migração celular (MITRA *et al.*, 2005).

Uma das mais importantes vias de sinalização através da ativação da FAK é a via da MAPK. Estas proteínas são importantes componentes de sinalização que atuam na conversão de estímulos extracelulares para uma ampla gama de respostas celulares. A ativação desta quinase requer a fosforilação do motivo TXY (Thr-X-Tyr) de sua cadeia de aminoácidos. Após ativada, a MAPK atua na fosforilação dos resíduos de serina e treonina dos seus substratos-alvos (NEBREDA & WAGNER, 2009) e, assim, os membros dessa família integram sinais que afetam diversos processos celulares, tais como adesão, proliferação, sobrevivência e migração.

Normalmente, os processos adesivos celulares inibem a apoptose, enquanto que o descolamento celular a induz. Falhas no mecanismo apoptótico concomitantes à desadesão celular, são frequentemente correlacionadas com processos de malignização tumoral (PARISE *et al.*, 2000). Se por um lado sugere-se que a disfunção da sinalização por integrinas pode estar relacionada com a malignização celular, por outro, essas moléculas precisam manter suas funções adesivas para a invasão de um novo tecido durante a metástase.

#### **1.4. Integrina $\alpha_v\beta_3$**

Algumas subclasses de integrinas têm recebido especial atenção pelo seu importante envolvimento na história natural de tumores de grande prevalência, como, por exemplo, os processos de migração celular e angiogênese. As integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  mediam a migração celular de forma constitutiva e dependente de fatores de crescimento, respectivamente (ZHOU *et*

*al.*, 2000). A integrina  $\alpha_v\beta_3$  atua também no processo de formação de novos vasos, sendo fracamente expressa em vasos quiescentes, mas altamente expressa em vasos angiogênicos (BROOKS *et al.*, 1994b).

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 diferentes proteínas que compõem a MEC, 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). Em mamíferos, algumas integrinas são limitadas para certos tipos celulares ou tecidos:  $\alpha_{IIb}\beta_3$  para plaquetas,  $\alpha_6\beta_4$  para queratinócitos;  $\alpha_4\beta_1$  para leucócitos;  $\alpha_4\beta_7$  para parte das células T de memória; e integrinas  $\beta_2$  para leucócitos.

A integrina  $\alpha_v\beta_3$ , também conhecida como receptor de vitronectina, é amplamente expressa em células endoteliais de proliferação vascular, diversas células tumorais e certas populações de leucócitos. Entretanto não está presente em células endoteliais quiescentes e na maioria dos tecidos normais, o que a torna apropriada como alvo para terapia anti-tumoral. (ZHANG *et al.*, 2010).

Mahabeleshwar e colaboradores (2007) demonstraram uma íntima interação entre a integrina  $\alpha_v\beta_3$  e o receptor-2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-2), de forma que a  $\alpha_v\beta_3$  ativa o receptor-2, disparando um sinal de sobrevivência para a proliferação de células vasculares. Adicionalmente, a integrina  $\alpha_v\beta_3$  parece ser essencial na etapa de vacuolização e formação de lúmen.

Outro aspecto que tem sido descrito é que a integrina  $\alpha_v\beta_3$  está sob controle fino do VEGF. Ela não é expressa em vasos quiescentes, mas o VEGF induz a expressão desta integrina *in vitro* e, de maneira interessante, o fator de crescimento endotelial e a expressão da integrina

em questão também estão intimamente correlacionados *in vivo*. Estes dados reforçam a concepção de que a  $\alpha_v\beta_3$  pode ser considerada um marcador de células tumorais e endoteliais ativas, de forma a apresentar um alvo terapêutico importante (SANTULLI *et al.*, 2011).

Alguns estudos mostram que no ambiente cerebral a integrina  $\alpha_v\beta_3$  ativada sustenta o crescimento tumoral baseada na superexpressão do fator de crescimento endotelial vascular, resultando em uma ação conjunta angiogênese/metástase, sob condições de normóxia e, assim, permitindo a disseminação de células tumorais pela circulação. Essa disseminação acontece através da expressão de VEGF pelas células tumorais, o que acarreta alteração nas VE-caderinas das células endoteliais cerebrais e, conseqüentemente, a integridade da barreira hematoencefálica. A perda da integridade desta barreira permite a adesão das células tumorais e facilita o extravasamento para o tecido cerebral (ARSHAD, F. *et al.*, 2011).

Diferentemente, o processo de formação de vasos e metástases ocorre de forma distinta em outros tecidos, como por exemplo nos depósitos de gordura mamária (*mammary fat pad* - MFP). Neste local, a  $\alpha_v\beta_3$  não apresenta efeito crescimento de lesões, as quais são pobremente vascularizadas, hipóxicas e relacionadas à necrose e apoptose. Dessa forma, a habilidade específica da integrina  $\alpha_v\beta_3$  ativada de aumentar a angiogênese claramente depende do microambiente tecidual (LORGER *et al.*, 2009).

Em concordância com estes estudos, Liu e colaboradores (2009) mostraram que plaquetas podem se ligar a células tumorais via integrina  $\alpha_v\beta_3$  através de pontes de fibronectina, fibrinogênio ou fator de von Willebrand. Nestes estudos, hipotetiza-se que as plaquetas formem uma capa na superfície celular, o que pode levar à redução ou evitar a exposição destas células ao estresse de cisalhamento. Por outro lado, esta agregação plaquetária forma microtrombos locais que resultam em aumento da viscosidade sanguínea local, provocando maior chance de

adesão das células tumorais ao endotélio e, conseqüentemente, facilitando o extravasamento e invasão de um novo tecido (LIU, Y. *et al.*, 2009).

### **1.5. Desintegrinas**

A busca de novos medicamentos, cada vez mais específicos, e com menores efeitos colaterais vem se intensificando no Brasil, principalmente devido ao avanço da tecnologia disponível. Melhores alvos farmacêuticos podem ser determinados pela resolução das estruturas cristalográficas de novas proteínas, permitindo o desenho racional de inibidores que possam atuar com a especificidade desejada. Assim as toxinas de serpentes representam uma vasta biblioteca para o descobrimento de novos fármacos devido sua forte atuação em sistemas vivos, muitas vezes exibindo seus efeitos em quantidades baixíssimas e com alta especificidade. A retrospectiva da utilização de toxinas de serpente nos revela vários casos bem sucedidos no desenvolvimento de fármacos, como por exemplo os inibidores da enzima conversora de angiotensina, além de servirem muitas vezes como ferramentas na investigação de processos biológicos.

Dentre as serpentes peçonhentas, a família *Viperidae* compreende um grupo com 180 espécies (GONZALES-RIVERA *et al.*, 2009). O subgrupo com grande importância no Brasil dentro esta família é o gênero *Bothrops* e, segundo dados de análise morfológica e de material genético mitocondrial, foi reclassificado. De acordo com essa reclassificação, o gênero *Bothrops* ficou restrito à espécie *Bothrops atrox*; e foi criado um novo gênero, o *Bothriopsis* para as espécies *Bothrops newiedi* e *Bothrops jararaca*; e o gênero *Rhinocerophis* para os demais representantes do grupo (Tese de Doutorado Pontes, C.L.S – dados não publicados). Um

representante em particular, a espécie *Bothrops alternatus*, passou a ser denominado *Rhinocerothis alternatus* (FENWICK *et al.*, 2009).

Essa espécie é característica de alguns países da América do Sul, como região central da Argentina, região meridional do Uruguai e sudeste, sul e centro-oeste do Brasil. Além disso, essas serpentes preferem ambientes úmidos (ROCHA & FURTADO, 2005).



Figura 10 – Foto de uma serpente *Rhinocerothis alternatus*. Extraída de BORGES-MARTINS *et al.*, 2007.

Um estudo do perfil proteômico do veneno de *Bothrops alternatus* revelou uma elevada porcentagem de metaloproteases (acima de 50%) (CARDOSO, K.C., *et al.*, 2010). Além disso, o veneno também é composto por serinoproteases, fosfolipases, aminoácidos, íons inorgânicos e inibidores de trombina (OHLER *et al.*, 2010).

As metaloproteases do veneno de serpentes, denominadas SVMPs (*Snake Venom Metalloproteases*) são proteases dependentes de zinco. Essas SVMPs foram classificadas em 4 categorias, de acordo com as estruturas dessas proteínas e adições de domínios protéicos ao domínio catalítico. São elas: P-I, P-IIa-b, P-IIIa-b e P-IV. A P-I constitui em SVMPs com apenas

um domínio catalítico; a P-II tem um domínio desintegrina com motivo de ligação K/RGD adicional ao motivo metaloprotase; a classe P-III são as SVMPs com domínio rico em cisteína localizado na região C-terminal do domínio tipo desintegrina, com motivo adesivo D/ECD; e a classe P-IV apresenta um domínio tipo lectina adicional à região C-terminal rico em cisteína (FOX & SERRANO, 2008). Entretanto, em estudos de transcriptoma e proteômica dos venenos de serpentes foi observado que as SVMPs da classe P-IV são derivadas de uma modificação pós-transcricional do transcrito das SVMPs da classe P-III. Assim, os autores sugeriram uma nova classificação, como mostrado na figura 11.

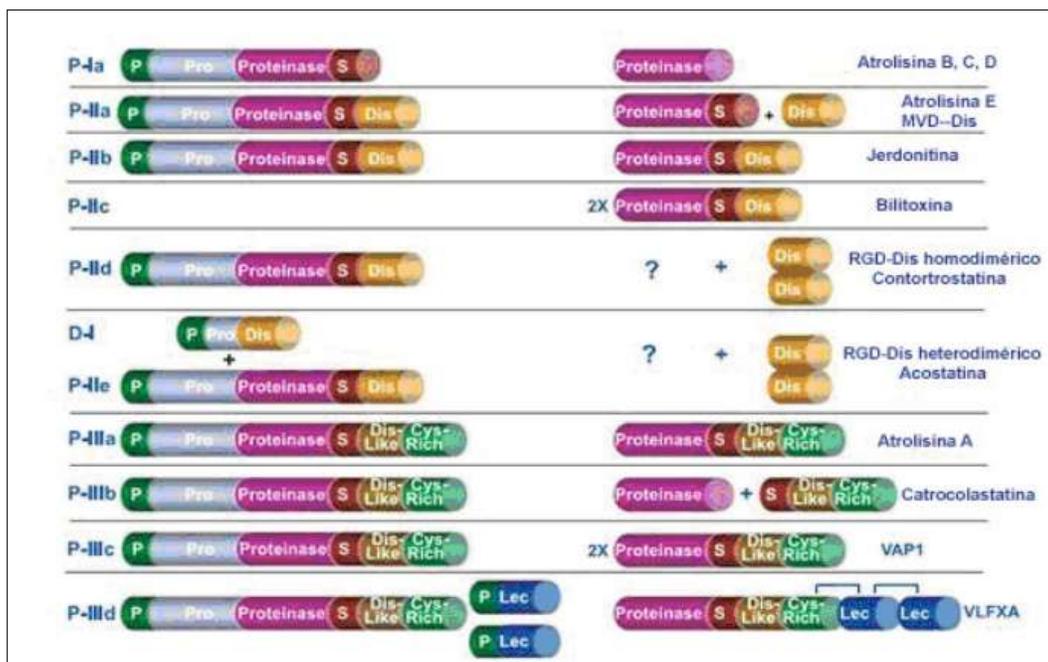


Figura 11 – Classificação de SVMPs. Extraído e adaptado de FOX & SERRANO (2008)

Neste contexto, encontram-se as desintegrinas, moléculas que são derivadas de venenos de serpentes, ricas em cisteína, sem atividade enzimática e que apresentam homologia no arranjo de cisteínas na estrutura primária (GOULD *et al.*, 1990). As desintegrinas foram descritas pela primeira vez em 1990 (GOULD *et al.*, 1990) para designar um grupo de polipeptídios ricos em

cisteínas e que possuem um padrão de pontes de dissulfeto bastante conservado. Elas podem existir nas formas monoméricas e diméricas e são divididas de acordo com o seu tamanho e número de ligações dissulfeto (tabela 1). Além disso, esses polipeptídeos apresentam também uma região estrutural em formato de alça (*loop*), a qual é mantida por pontes de dissulfeto e que, quando rompidas, eliminam a atividade de ligação à integrinas (McLANE *et al.*, 1998).

Tabela I – Classificação de desintegrinas por tamanho e número de ligações dissulfeto. Extraído de CALVETE *et al.*, 2005.

<b>Comprimento</b>	<b>Número de a.a</b>	<b>Número de ligações dissulfeto</b>
<b>Pequenas</b>	41-51	4
<b>Médias</b>	~70	6
<b>Longas</b>	~84	7
<b>Diméricas</b>	~67 (por cadeia)	10 (4 intra e 2 intercadeia)

As desintegrinas, especialmente, representam uma classe de moléculas muito interessantes e potencialmente usadas para tratamentos que envolvam processos mediados por integrinas, como as metástases e angiogênese. Drogas, tendo como alvo as integrinas, têm sido desenvolvidas baseadas nas seqüências de reconhecimento desses receptores e na estrutura de desintegrinas. Recentemente foram desenvolvidos fármacos contra a trombose e outras doenças cardiovasculares associadas, utilizando como protótipo polipeptídios de baixa massa molecular (49-84aa; 5-9kDa) presentes em venenos crotálicos e viperídicos, as desintegrinas. Pode-se citar como exemplo o Eptifibatide (Integrilin<sup>®</sup>), um heptapeptídeo cíclico derivado do veneno *Sistrurus miliarius barbouri*, que atua como inibidor da glicoproteína IIb/IIIa e tem ação antitrombótica (FISCHELL *et al.*, 2009; BINDRA & SIKKA, 2010; PUDDU *et al.*, 2010).

Outra característica está relacionada ao motivo R/KGD (Arg/Lys-Gly-Asp), comumente encontrado no ápice da alça, e a região C-terminal destas moléculas. Tratam-se de duas regiões

que estão diretamente relacionadas às interações com as integrinas (MARCINKIEWICZ *et al.*, 1997) e, por isso, a manutenção dos aminoácidos, das sequências adjacentes e da conformação das pontes de dissulfeto são fundamentais para a atividade da desintegrina. A perda dessa estrutura acarreta na redução da potência da molécula, bem como sua perda de atividade e interrupção da ligação às integrinas (GOULD *et al.*, 1990; McLANE *et al.*, 1998). Dessa forma, peptídeos que mimetizam o motivo RGD estão sendo testados para o tratamento do câncer através da inibição da angiogênese e metástase tumoral (FILARDO *et al.*, 1995; SHEU *et al.*, 1997; BROOKS *et al.*, 1994a).

A ligação com integrinas geralmente é bastante forte, sendo necessárias concentrações nanomolares de desintegrina para a visualização dos efeitos biológicos (SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2010). Como exemplos, pode-se citar as desintegrinas equistatina e insularina, as quais apresentaram atividade inibitória da agregação plaquetária com IC<sub>50</sub> de 30 nM e 1.2 µM, respectivamente (GAN *et al.*, 1988; SÁNCHEZ, *et al.*, 2009; DELLA-CASA *et al.*, 2011).

Algumas desintegrinas foram descritas como potentes inibidores da angiogênese através da ligação com a integrina  $\alpha_v\beta_3$  e ação apoptótica, além de processos relacionados à proliferação celular. Exemplos de desintegrinas com estes efeitos são a acutina (*Agkistrodon acutus*; YEH *et al.*, 1998), inibidora da angiogênese, e a salmosina e jararastina, que foram capazes de inibir a proliferação de células B16F10 (KANG *et al.*, 2000 ; OLIVA *et al.*, 2007), sendo que a salmosina, em outro estudo, mostrou ser capaz de levar à apoptose células de BCE (*Bovine Capillary Endothelial*) por *anoikis* (HONG *et al.*, 2003).

Dentre a gama de desintegrinas, encontra-se DisBa-01. Essa molécula recebe este nome pelo fato de se tratar de uma desintegrina (Dis) e por ser derivada do veneno da antiga *Bothrops alternatus* (DisBa-01). Ela é uma proteína recombinante, derivada do veneno da serpente

*Rhinocerothis alternatus* e obtida por expressão heteróloga em *Escherichia coli*, que possui motivo RGD em sua sequência de aminoácidos (RAMOS *et al.*, 2008)

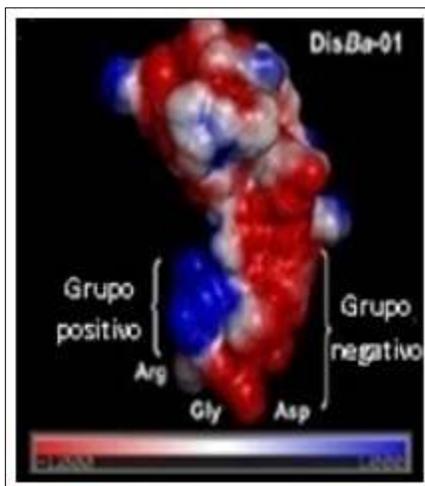


Figura 12 – Desintegrina de *Bothrops alternatus* (DisBa-01). Potencial eletrostático da proteína. Em azul, região de aminoácidos carregados positivamente. Em vermelho, região de aminoácidos carregados negativamente. Em cinza, aminoácidos neutros. Extraído e adaptado de RAMOS *et al.* (2008).

Esta desintegrina possui elevada afinidade ( $IC_{50}=225nM$ ) com o receptor de membrana  $\alpha_v\beta_3$  (RAMOS *et al.*, 2008). Kauskot e colaboradores (2008) descreveram a interferência da DisBa-01 na atividade da proteína quinase de adesão focal (FAK), de forma a inativar a enzima e desencadear alterações na cascata de sinalização intracelular. Além disso, estudos realizados em nosso laboratório mostraram que a desintegrina também inibe a adesão de células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231 ao colágeno tipo I sob condições de fluxo e presença de sangue e plaquetas. Esses resultados sinalizam que a inibição da adesão de células ao colágeno tipo I, através da integrina  $\alpha_v\beta_3$ , pode indicar um novo caminho para a inibição da angiogênese, uma vez que a ligação da integrina  $\alpha_v\beta_3$  ao colágeno desencadeia a síntese deste último, o qual atua no início do processo angiogênico.

Os trabalhos realizados em nosso laboratório também reportaram que a desintegrina DisBa-01 inibiu a expressão de VEGF e de seus receptores em células endoteliais, mas não em fibroblastos e células de câncer de mama, sugerindo diferentes vias de sinalização para a síntese de VEGF. Além disso, a DisBa-01 foi capaz de inibir a migração de fibroblastos e MDA-MB-231, processo que está relacionado à expressão de metaloproteases de matriz (MMPs).

Outros estudos também mostraram que fibroblastos tratados com DisBa-01 apresentaram redução na expressão de MMP-2, o que contribuiu para a redução na atividade migratória destas células. Adicionado a estes resultados, experimentos de interação entre células MDA-MB-231 e DisBa-01 mostraram que a desintegrina é capaz de internalizar nas células, o que sugere a ligação entre essas duas moléculas e internalização da DisBa-01 mediada por integrina.

## **1.6. Fluxo sanguíneo e cisalhamento**

O processo metastático requer células tumorais vivas circulantes no meio sanguíneo. As células tumorais circulantes representam uma fase intermediária no processo metastático e, como tal, estão sujeitas às diversas interferências do meio no qual estão inseridas, tais como forças mecânicas de cisalhamento, proteínas do plasma e mesmo à células do próprio local onde se encontram (GOMES, N. *et al.*, 2004; BARNES, J.M. *et al.*, 2012).

Pesquisas relacionadas à disseminação das células tumorais reportam que o evento mais crítico do processo metastático consiste na sobrevivência das células tumorais na corrente sanguínea. Isso se deve ao fato de que células tumorais circulantes são rapidamente destruídas por forças mecânicas de cisalhamento e/ou decorrente da ação do sistema imune. Assim, do montante celular no qual o tumor primário é constituído, somente 0,01% completa o processo de metástase (PERRET & CRÉPIN, 2008; PONTIER & MULLER, 2008)

Alguns estudos mostram que células metastáticas humanas e animais apresentam habilidades de agregação plaquetária, uma característica que está correlacionada ao seu potencial metastático. Além disso, interações entre células tumorais e plaquetas tem sido consideradas como facilitadoras do agrupamento de células tumorais e permanência na microvasculatura (TSURUO, T. & FUGITA, N., 2008). Essas observações são compartilhadas com Liu e colaboradores (2009) em estudos de interação entre a integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , presente na superfície de plaquetas, e a integrina  $\alpha_v\beta_3$ , de células tumorais.

De acordo com Jain e colaboradores (2010), as plaquetas apresentam um papel de auxílio no que diz respeito à proteção das células tumorais dentro dos vasos sanguíneos. Essa proteção envolve três tipos de cooperação: (i) as plaquetas, juntamente com fatores de coagulação que interagem com as células tumorais, formam agregados e, assim, auxiliam no extravasamento para o nicho metastático, através da redução da força de cisalhamento sobre as células tumorais, permitindo uma melhor adesão das células tumorais às endoteliais; (ii) formando mantos de plaquetas ao redor das células tumorais, protegendo-as contra atividade citotóxica das células NK do sistema imune e (iii) armazenando diversos fatores de crescimento, proteases e moléculas que auxiliem no crescimento tumoral, invasão e angiogênese.

Estudos com a desintegrina DisBa-01 e células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231 mostraram a inibição da adesão, sob condição de fluxo, das células tumorais ao colágeno tipo I quando as células foram tratadas com concentrações de 100 e 1000nM de desintegrina (MONTENEGRO, C. F. *et al.*, 2012), sugerindo a ação anti-metastática desta proteína.

Desta forma, o conhecimento crescente sobre os mecanismos moleculares envolvidos no processo angiogênico e metastático é muito útil na descoberta de novos alvos moleculares, bem

como no desenvolvimento racional de novos fármacos mais eficientes e seguros para a terapia anti-metastática. Neste sentido, o estudo da integrina  $\alpha_v\beta_3$  no processo metastático se torna importante, uma vez que este receptor de membrana está intimamente vinculado à migração celular e a utilização de uma molécula antagonista à este receptor pode auxiliar na pesquisa e desenvolvimento de fármacos baseados em proteínas de venenos de serpentes.

## 2. OBJETIVOS

Geral:

- Contribuir para o conhecimento do papel da integrina  $\alpha_v\beta_3$  ( $\alpha_v\beta_3$ ) no microambiente tumoral;
- Ampliar o conhecimento dos efeitos inibitórios da DisBa-01 sobre o receptor  $\alpha_v\beta_3$

Específicos:

- Inibir a integrina  $\alpha_v\beta_3$  através da geração de clones *knockdown* (sem a expressão) da subunidade  $\beta_3$  de integrinas, utilizando a técnica de silenciamento de RNA para a verificação do efeito da integrina  $\alpha_v\beta_3$  ( $\alpha_v\beta_3$ ) na capacidade invasiva de células tumorais;
- Verificar a especificidade da DisBa-01 através da técnica de *time lapse*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Linhagens celulares e condições de cultivo

Foram utilizadas células de tumor humano de mama (MDA-MB-231) transfectadas e não transfectadas com GFP, e células endoteliais humanas de microvasculatura de derme (HMEC – *Human Microvascular Endothelial Cells*). As células MDA-MB-231 foram gentilmente cedidas pelo Dra. Clara Nahmias. A Profa. Dra. Verônica Morandi (UERJ) cedeu gentilmente as células da linhagem HMEC. As células MDA-MB-231 foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Gibco), contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), L-glutamina (2mM), penicilina (100U/mL), estreptomicina (100ug/mL) e anfotericina B (250UG/mL) (Gibco), respectivamente. A cultura celular foi mantida em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Células HMEC foram cultivadas em meio MCB 131 (Sigma), contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), L-glutamina (2mM), penicilina (100U/mL), estreptomicina (100ug/mL), anfotericina B (1000UG/mL) (Gibco), EGF (*Epidermal Growth Factor* – 10ng/mL), bicarbonato de sódio (2,36mg/mL) e hidrocortisona (1ug/mL). As culturas celulares foram mantidas em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C.

#### 3.2. Obtenção da desintegrina DisBa-01

O antagonista da integrina  $\alpha_v\beta_3$ , a desintegrina DisBa-01, derivada do veneno da serpente *Rhinocerosphis alternatus*, foi obtida através de processo de expressão heteróloga e purificação já estabelecido em nosso laboratório, seguindo a metodologia de Ramos *et al* (2008). Brevemente, culturas de *E. coli* BL21(DE3) pDisBa-01 (pET-28a com o cDNA da desintegrina) foram crescidas em meio LB seletivo contendo canamicina (30  $\mu$ g/mL). Após este período, o pré-inóculo

foi diluído em LB seletivo contendo canamicina (30 µg/mL) e a cultura foi incubada a 37°C sob agitação, até atingir a fase logarítmica de crescimento, identificada por uma  $D.O_{660nm} = 0.4 - 0.6$ . A cultura em fase log 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 250 rpm. Após três horas de incubação, a cultura foi centrifugada, ressuspensa e lisada por ondas ultrasônicas. Para a retirada da proteína dos corpos de inclusão, houve uma nova ressuspensão em tampão contendo uréia (6M), seguida de sonicação. O lisado foi submetido a uma purificação sob condições desnaturantes por meio de cromatografia de afinidade em resina de Níquel-NTA Sepharose (Qiagen). A proteína, eluída em gradiente de imidazol, foi dialisada contra uréia e água e submetida a uma segunda etapa de purificação em coluna Mono Q 5/50 (GE Healthcare) em gradiente de NaCl. Todas as etapas e frações foram analisadas com SDS-PAGE e armazenadas a 4° C.

### **3.3. SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Poliacrylamide Gel Electrophoresis*)**

A expressão da desintegrina DisBa-01, assim como as frações eluídas provenientes dos processos cromatográficos, foram acompanhados através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (LAEMMLI, 1970), utilizando o sistema *Mini-PROTEAN Tetra System (BioRad)*. O gel de empilhamento foi preparado em uma concentração de 5% de poliacrilamida, enquanto para o gel de separação foi utilizada a concentração de 15%.

Para a aplicação das amostras (20ug) no gel, foi usado um tampão constituído de Tris-HCl 0,125M, pH 6,8, dodecil sulfato de sódio (4% m/v), azul de bromofenol (0,025% m/v) e glicerol (20% v/v). Para a análise das amostras sob condições desnaturantes, foi adicionado ao tampão de amostra o agente redutor β-mercaptoetanol (concentração final de 0,1M), em uma

proporção de 1 parte de tampão de amostra para 2 partes de amostra. Antes da aplicação no gel, as amostras foram fervidas durante 5 minutos a 100°C. Após essa preparação, as amostras foram submetidas à eletroforese em uma corrente elétrica de 25mA e 80V no gel de empilhamento e 130V no gel de separação.

As bandas protéicas foram reveladas incubando o gel de poliacrilamida em solução corante contendo: 0,25% (v/v) de *Comassie Blue R-250* (Sigma, USA) dissolvido em 50% (v/v) de isopropanol e 10% (v/v) de ácido acético, durante 30 minutos, seguido de incubação em solução descorante de 10% (v/v) de ácido acético e 10% (v/v) de metanol. Os padrões de massas moleculares utilizados foram produzidos em nosso laboratório a partir de proteínas purificadas obtidas da SIGMA. As bandas protéicas foram detectadas por coloração com *Comassie Brilliant Blue R-250* (Sigma Aldrich).

### **3.4. Quantificação de proteína**

A determinação da concentração protéica das amostras foi realizada utilizando o *kit* de detecção colorimétrica BCA (*BCA™ Protein Assay Kit*, Pierce) conforme informações do fabricante utilizando-se BSA para a construção da curva padrão. A leitura foi realizada em um leitor de placa (*Dynex Revelation 4.02 - software*) em comprimento de onda de 540nm.

### **3.5. Marcação de proteína com fluoróforo Alexa Fluor 555**

A desintegrina *DisBa-01* foi marcada com o fluoróforo Alexa Fluor 555 (Invitrogen). De acordo com esta metodologia, o fluoróforo foi solubilizado em 72uL DMSO, seguindo instruções do fabricante. Em seguida a 4ug proteína foi incubada com 18uL dessa solução por 15 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz. Posteriormente, a proteína conjugada ao fluoróforo

foi submetida a uma diálise em membrana com poros de 3,5 kDa, contra PBS 1X durante 12h, a 4°C e protegido da luz. Após este período, a proteína marcada foi mantida a -20°C.

### 3.6. Silenciamento de RNA (siRNA)

Foi realizado o silenciamento de RNA da subunidade  $\beta_3$  da integrina  $\alpha_v\beta_3$ , com o *kit* (*Silencer<sup>®</sup> siRNA Starter Kit* - Ambion). Células MDA-MB-231 ( $2 \times 10^5$ ) células foram cultivadas em placas de Petri de 6cm de diâmetro em 5mL de meio de cultura DMEM por placa, suplementado com 10% de FBS, mas sem antibiótico e sem fungizona. Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS 1X e houve acréscimo do agente de transfecção (Lipofectamina 2000, Invitrogen) e oligonucleotídeo de silenciamento do RNA da seguinte forma: A) em dois microtubos foram colocados 10ul de lipofectamina misturada gentilmente com 490ul de OPTIMEM (Invitrogen), em cada microtubo, e incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. B) Em um terceiro microtubo, foi colocado 1ul (5nM) do oligonucleotídeo de silenciamento de RNA (siRNA ID 112581 – Ambion – Applied Biosystems – Life Technologies, sequência: senso 5'- GCUAAUUCUUUGACCUGUUt - 3'; antisenso 5'- AACAGGUCAAAGAAUUAGCtt - 3'), juntamente com 499ul do meio OPTIMEM. Nesta etapa, o conteúdo de um dos dois microtubos da **etapa A** foi misturado ao conteúdo do microtubo da **etapa B**, completando um volume final de 1mL. No tubo restante da **etapa A**, foi adicionado 500ul de meio OPTIMEM, completando 1mL de mistura final. Estes microtubos foram incubados por 20 minutos em temperatura ambiente. Transcorrido o tempo de incubação, os conteúdos foram adicionados às placas de Petri devidamente identificadas (com as células cultivadas), completando para um volume final de 5mL.

Dessa forma, foram obtidos os seguintes grupos de experimento: (i) células controle, sem tratamento com agente de transfecção e sem *primer* de silenciamento (siRNA/ITGB3), com apenas 1mL de meio OPTIMEM + 4mL de meio de cultura ; (ii) células tratadas somente com agente de transfecção (Lipofectamina 2000, Invitrogen) + 4mL de meio de cultura; (iii) células silenciadas, tratadas com agente de transfecção e o *primer* de silenciamento do RNA (siRNA/ $\beta_3$ )(*Silencer*<sup>®</sup> *siRNA Starter Kit* – Ambion) + 4mL de meio de cultura.

Cada tratamento foi realizado em quadruplicata. Vinte e quatro horas após a transfecção, o meio de cultura foi removido e foram adicionados 5mL de novo meio de cultura DMEM, contendo 10% de soro fetal bovino, antibiótico e fungizona. Após 72h do procedimento, o meio de cultura foi novamente removido, as células lavadas com PBS 1X e removidas das placas de Petri com o reagente Trizol (Invitrogen) para extração de RNA total, de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.6.1. Extração de RNA total**

Para a extração de RNA total das células MDA-MB-231, foram utilizadas placas de Petri com 6 cm de diâmetro e três tipos de tratamentos citados acima (**Silenciamento de RNA (RNAi)**). Após os tratamentos e incubações, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS1X (2mL/placa de Petri) e em seguida foram lisadas com a utilização do reagente TRizol (Invitrogen).

Para a homogeneização das amostras, 1mL de TRizol foi adicionado às placas contendo as células. A solução de lise foi passada repetidas vezes sobre a superfície da placa, com auxílio de pipeta, para completa homogeneização e lise das células. Posteriormente, foi realizada a centrifugação das amostras a 12000 x g por 10 minutos (4°C), transferência do sobrenadante para

um novo microtubo e tratamento com clorofórmio para separação das diferentes frações (DNA, RNA e proteínas). A fase aquosa contendo o RNA foi transferido para um novo microtubo e tratado com isopropanol para precipitação do RNA total, que foi centrifugado e lavado com etanol 75%. Após secagem do etanol, o RNA total foi ressuscitado em água livre de RNase e as amostras armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

As amostras de RNA total foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1%, para verificação da qualidade do RNA extraído.

### **3.6.2. Gel de Agarose-formaldeído 1%**

O gel de agarose-formaldeído foi preparado com os seguintes reagentes: agarose 3% (Sigma), tampão MOPS 10X (MOPS 0,2M, acetato de sódio 0,05M e EDTA 0,01M), seguido de resfriamento a, aproximadamente,  $50^{\circ}\text{C}$ . Após o resfriamento, foram adicionados 1,62mL de formaldeído 37% (concentração final de 2%) à solução, a qual foi levada à cuba de eletroforese de RNA (Gibco), também tratada previamente com RNase. O tampão de corrida utilizado, foi o MOPS 1X. Previamente à aplicação das amostras no gel, elas foram diluídas em tampão de amostra (formamida 48%, tampão MOPS 10X, formaldeído 4%, glicerol 5%, azul de bromofenol saturado 5%, brometo de etídeo 1,5mg/mL e água) e, então, submetidas à eletroforese a uma voltagem de, aproximadamente, 80-90V, por, aproximadamente, 1 hora e em temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . O RNA total foi quantificado por espectrometria em comprimento de onda de 260nm e 280nm. Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água livre de RNase tratada com 0,01% de DEPC, assim como os materiais plásticos e vidrarias, os quais receberam tratamento com peróxido de hidrogênio 0,1%, seguido de água livre de RNase.

### 3.6.3. Primers para qPCR

Os oligonucleotídeos utilizados para análise de expressão gênica da subunidade  $\beta_3$  de integrinas, através da técnica de PCR quantitativa, foram desenhados com auxílio do *software GeneRunner 3.01*. Os primers para amplificação da subunidade  $\beta_3$  foram desenhados abrangendo a junção de diferentes éxons, com a finalidade de restringir a amplificação a partir de moldes de cDNA, inviabilizando a amplificação a partir de DNA genômico contaminante. Os *primers* utilizados foram desenhados em uma região conservada, para obtenção de um amplicon com tamanho de aproximadamente 114 pares de bases:

ITGB3 <i>Foward</i> : GATGCGAAAGCTCACAGTA
ITGB3 <i>Reverse</i> : GCAAGCAGGTGGTCTTCATA

Figura 13 – Sequência de nucleotídeos dos primers para o gene da Integrina  $\beta_3$  (sequência com número de referência NM\_000212.2 no banco de dados do NCBI)

Neste trabalho foram usados os seguintes genes constitutivos, em testes que apresentaram 98% de eficiência com ambos genes constitutivos:

- Gene da Gliceraldeído 3 Fosfato Desidrogenase (GAPDH), com a sequência e tamanho do amplicon de 197 pares de bases

*Foward*: GATGCTGGTGCTGAGTATGTCG

*Reverse*: GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA

- Gene da Hipoxantina Guanina Fosforibosiltransferase 1 (HPRT1), com a sequência e tamanho do amplicon de aproximadamente 94 pares de bases.

*Foward*: TGACACTGGCAAACAATGCA

*Reverse*: GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT

Esses testes foram importantes para a verificação da expressão desses genes, que se tornaram referências para a análise da expressão do gene da integrina  $\beta_3$ .

#### **3.6.4. Produção de cDNA e PCR (reação em cadeia da polimerase) quantitativo**

O RNA total extraído das células MDA-MB-231 foi submetido à uma reação com a utilização da transcriptase reversa *Moloney Monkey Leukemia virus reverse transcriptase* (M-MLV - Promega). Todas as amostras foram tratadas com DNase I (*Deoxyribonuclease I, Amplification Grade* – Invitrogen) para evitar a contaminação com DNA genômico. Este tratamento foi realizado com a adição de 1uL de tampão (10X DNase I *Reaction Buffer*), 1uL da enzima DNase I, 1ug de RNA total e quantidades variáveis de água tratada com DEPC para atingir um volume final de 10uL. Essa mistura foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente, seguido da adição de 1uL de EDTA e incubação a 65°C por 10 minutos.

Para a produção do cDNA, 0,1ug de RNA foi tratado com 0,5uL de primer Oligo-DT (0,5ug/uL - Promega) e água livre de nucleases, em um volume final de 8uL. Nesta etapa, as amostras foram incubadas a 70°C por 5 minutos, seguido de resfriamento em gelo e adição dos demais ítems da reação, respectivamente: 0,5uL de M-MLV 5X (200U/uL, concentração final de 1X), 2,5uL de tampão M-MLV 5X (concentração final 1X - Promega), 2,5uL de dNTPs (concentração inicial de 10nM) e água para completar o volume de 25uL. Após a adição desses componentes, as amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora.

O cDNA foi utilizado para realização de reação em cadeia da polimerase em tempo real, com adição de SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Fermentas). O processo foi feito em duplicata, com auxílio do *software Rotor Gene – 6*, no equipamento *Rotor Gene RG 3000 (Corbett Research)*. As amostras submetidas a este processo foram compostas pelos seguintes ítems:

Tabela II – Composição da mistura preparada para a reação de qPCR

<b>cDNA = 0,002ug</b>
<b>Primer ITGB3 ou HPRT senso (5uM) = 1,25uL</b>
<b>Primer ITGB3 ou HPRT antisenso (5uM) = 1,25uL</b>
<b>SYBR Green (Fermentas) = 12,5uL</b>
<b>Água livre de RNase = 9,5uL</b>

Essas concentrações de cDNA e primers foram determinadas por meio de uma padronização realizada com diluições crescentes de cDNA e primers, as quais foram analisadas através de PCR quantitativo.

O programa utilizado no termociclador consistiu nos seguintes parâmetros:

Tabela III – Parâmetros utilizados no termociclador para a reação de RT-PCR

<b>1 ciclo de 95°C por 10 minutos (“hold”)</b>	
<b>40 ciclos de</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 95°C por 15 segundos</li> <li>▪ 53°C por 30 segundos</li> <li>▪ 72°C por 30 segundos</li> </ul>

Os dados provenientes do *software*, de acordo com os tratamentos realizados nas amostras, foram normalizados para construção das unidades arbitrárias, seguindo os cálculos a seguir:

- Unidade arbitrária =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , em que:
  - $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ controle}$
  - Ct: *threshold cycle*

Os dados foram analisados usando a equação de Livak e Schmittgen, onde a variação na expressão de cada gene é igual a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . O ciclo limiar (Ct) indica o número dos ciclos onde a quantidade de gene amplificado atinge o limiar fixado.  $\Delta Ct$  é o  $Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{controle}}$  e o  $\Delta\Delta Ct$  é o  $\Delta Ct - \text{Média } \Delta Ct_{\text{grupo controle}}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

### **3.6.5. Cinética do silenciamento do gene codificante para a subunidade $\beta_3$**

O silenciamento de células MDA-MB-231 com siRNA para a subunidade da integrina  $\beta_3$  é realizado de forma transitória, como descrito no item 1.5.4. Desta forma para saber o tempo em que a célula permanece silenciada, foi preciso realizar uma cinética do silenciamento antes de iniciar os ensaios com as células tratadas com o siRNA. Com estes dados, foi possível verificar o tempo durante o qual a célula permanece com a expressão da integrina  $\beta_3$  reduzida.

Para isso, foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 2.6. Aleatoriamente, uma placa foi retirada em cada dia (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 dias após a transfecção das células com siRNA) para análise do silenciamento gênico. Destas placas, foi extraído o RNA total das células e esse material foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1%. Em seguida, foram sintetizados os cDNAs e analisados por PCR em tempo real.

### **3.6.6. Extração de proteínas totais**

As células da linhagem MDA-MB-231 foram cultivadas em estufa *water-jacketed*, na temperatura de 37° C e presença de 5% de CO<sub>2</sub>, até atingirem a confluência de 80% nas garrafas médias. Em seguida,  $2 \times 10^5$  células foram plaqueadas em placas de Petri de 6 cm e diâmetro, contendo 5 mL de meio de cultura. No dia do procedimento de extração de proteínas totais, o meio de cultura foi retirado das placas e as células lavadas com PBS 1X. Posteriormente, foram

adicionados 500 uL de tampão de lise, cuja composição é: NaCl 150mM, Hepes 50mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, Triton X-100 (1%), SDS (0,01%) e coquetel inibidor de protease (Sigma Aldrich), com pH 7,5. Todas as manipulações foram realizadas em gelo para evitar a degradação das proteínas. Em seguida, houve a determinação da concentração proteica e 20ug de cada amostra foram aplicados em gel de poliacrilamida 10%.

### **3.7. Western blotting**

Para os ensaios de *western blotting*, as amostras de proteínas celulares foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, seguida de transferência para membranas de nitrocelulose (BioRad) em sistema de transferência da Bio-Rad, para posterior incubação com anticorpos. Após a transferência, as membranas foram mantidas em solução de bloqueio (leite Molico<sup>®</sup> em pó desnatado 2,5% em tampão TBST) até o dia seguinte. Em seguida as membranas foram lavadas com tampão de TBST (*Tris-Buffered Saline Tween-20*) e incubadas durante 2 horas, com os anticorpos primários: anti- $\beta_3$  (1:2000) (Santa Cruz Biotechnology, INC) e anti-actina (1:2000) (Santa Cruz Biotechnology, INC). Posteriormente, as membranas foram lavadas novamente com tampão TBST e incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários conjugados com HRP (*horseradish peroxidase*) (1:5000) (Santa Cruz Biotechnology, INC). Em seguida, as membranas foram novamente lavadas com TBST e preparadas para a revelação da ligação dos anticorpos às proteínas presentes na membrana. Esta etapa de revelação ocorreu pela técnica de colorimetria, com o kit *Amplified Opti-4CN Substrate Kit* (BioRad). Após as lavagens, as membranas foram incubadas por 10 minutos, com uma solução de amplificação (*BioRad Amplification Reagent*), conforme instruções do fabricante. Em seguida, as membranas foram lavadas com DMSO 20% em TBST e posteriormente com TBST. As membranas foram, então,

incubadas com uma solução de estreptavidina-HRP 1% (5mL PBST 1X; 0,05g (1%) BSA; 5uL Strep-HRP), por 30 minutos e em seguida, lavadas com TBST. Após, as membranas foram incubadas com uma solução de revelação (Opti 4CN - BioRad), conforme instruções do fabricante.

### **3.8. Ensaio de Adesão celular sob condição de fluxo**

O efeito do siRNA/ITGB3 e da proteína recombinante DisBa-01 sobre a adesão das células tumorais foi analisado sobre as células endoteliais (HMEC-1) previamente plaqueadas em placas de Petri (3 cm). Quarenta e oito horas antes do ensaio de adesão sob fluxo propriamente dito, as células HMEC-1 ( $6 \times 10^5$ ) foram plaqueadas sobre lamínulas, previamente recoberta com gelatina 2% e fibronectina (20  $\mu\text{g/mL}$ ) e colocadas em placas de Petri (3 cm), cada placa contendo 2 mL de meio de cultura MCDB 131 (Sigma).

No dia do ensaio de adesão sob fluxo as células MDA-MB-231 (controle ou siRNA/ITGB3) foram previamente incubadas por 30 minutos com a DisBa-01 (100 e 1000 nM) e então misturadas a 4 mL de meio DMEM completo. As células controles foram incubadas somente com PBS (1X). As células misturadas ao meio de cultura DMEM foram perfundidas com o auxílio de uma bomba peristáltica sob condições de fluxo com uma taxa de cisalhamento de 5  $\text{dynes/cm}^2$  em uma câmara de perfusão durante 5 minutos. Para visualizar as interações entre células MDA-MB-231 e as células HMEC-1, as células tumorais foram previamente marcadas com *Cell Tracker Red* (Sigma) seguindo as instruções do fabricante. Após a perfusão, as células tumorais aderidas às células endoteliais foram lavadas com meio de cultura DMEM sem soro e fixadas com formaldeído 3,7%. Foram montadas lâminas, para visualização em microscópio. Campos aleatoriamente escolhidos nas lâminas foram fotografados e contados com

auxílio do programa Image J, após captura de imagens no microscópio de fluorescência Olympus BX50.

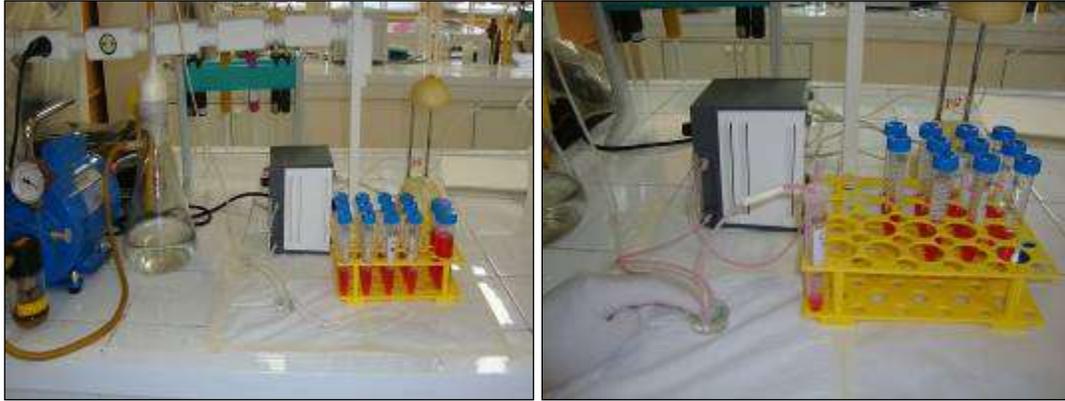


Figura 14 – Sistema de adesão sob fluxo padronizado e em uso. Fotos de Kelli Cristina Micocci.

### 3.9. Ensaio de Transmigração celular

Neste trabalho foi verificado o efeito do siRNA/ITGB3 e da proteína recombinante DisBa-01 sobre a transmigração das células de câncer de mama (MDA-MB-231) sobre as células endoteliais (HMEC-1). As células HMEC-1 ( $1 \times 10^5$  células/inserto) foram semeadas em insertos com poros de 8  $\mu\text{m}$  (12 poços/placa) (BD Biosciences), previamente recobertos com gelatina 2% e fibronectina (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), quarenta e oito horas antes ao ensaio de transmigração endotelial propriamente dito, para formação da monocamada de células endoteliais. Os insertos foram mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, com meio de cultivo com 10% de FBS na fase superior e na porção inferior, foi adicionado meio de cultura sem FBS.

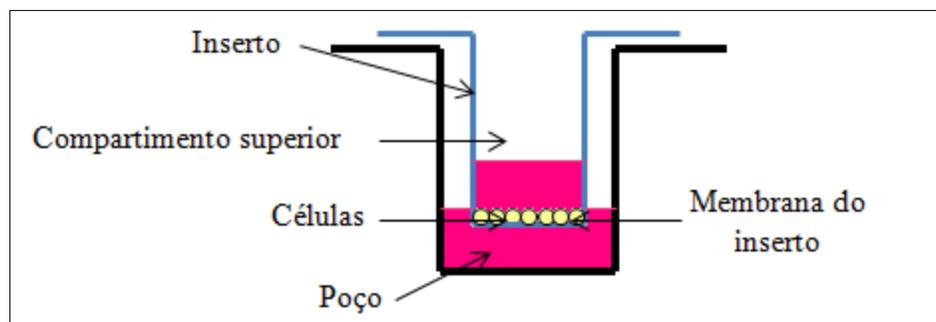


Figura 15 – Representação esquemática de um poço e inserto utilizados para o ensaio de transmigração

No dia do ensaio as células MDA-MB-231 (controles ou siRNA/ITGB3) foram primeiramente marcadas com *Cell Tracker Red* (Sigma) seguindo as instruções do fabricante. Após a marcação, as células foram contadas e previamente incubadas na presença ou ausência da DisBa-01 (10, 100, 500 e 1000 nM) por 30 minutos. Na face superior foram semeadas  $8 \times 10^4$  células tumorais em meio DMEM sem FBS (500  $\mu$ L) e na face inferior foi adicionado meio DMEM com FBS (1000  $\mu$ L – quimioatratante). Após 16 horas, as células tumorais que permaneceram na face superior da câmara foram retiradas com o auxílio de um cotonete e, as células que transmigraram para face inferior foram lavadas com meio de cultura DMEM sem soro e fixadas com formaldeído 3,7%. Em seguida, as células que migraram para a porção inferior da membrana, foram marcadas com DAPI (2ng/mL – Sigma Aldrich). Em seguida, o inserto foi retirado e a membrana recortada para montagem de lâminas e visualização em microscópio de fluorescência. Essa montagem foi realizada com a adição de 1 gota de óleo mineral à lâmina de microscopia, seguida da membrana do inserto e adição de mais 1 gota de óleo mineral, de acordo com o esquema abaixo:

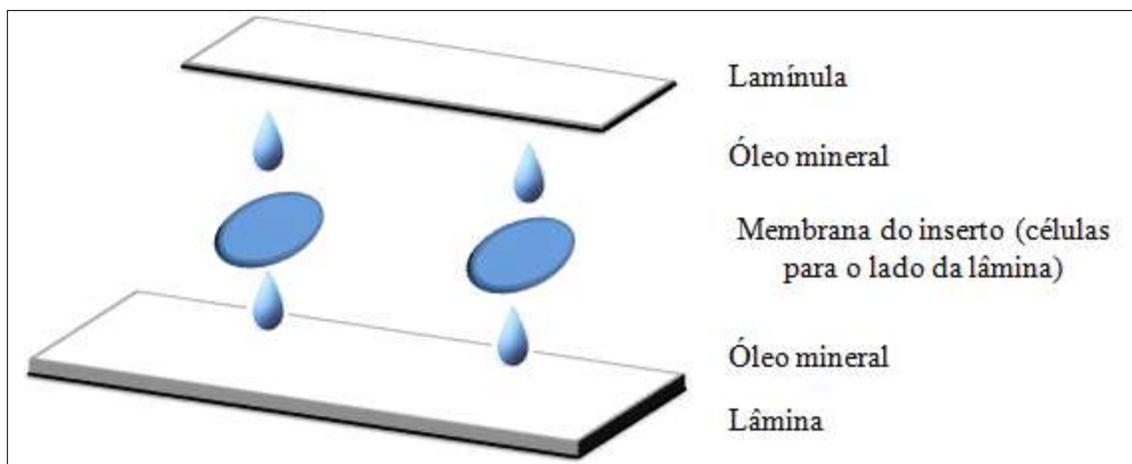


Figura 16 – Representação esquemática da montagem de lâminas para visualização em microscópio das membranas dos insertos

Dez campos distintos de cada inserto foram fotografados com o auxílio de uma câmera Olympus DP72 integrada ao microscópio Olympus BX50 e usando o software (DP2-BSW). As células que transmigraram foram contadas com o auxílio do programa Image J e as médias dos dez campos fotografados foram calculadas, sendo que cada tipo de tratamento (controle, lipofectamina, siRNA, DisBa-01) foi feito em triplicata. Os dados das imagens foram analisados estatisticamente de acordo com o item 3.11.

### 3.10. Ensaio de ligação celular por *Time lapse*

O ensaio de ligação celular por *time lapse* foi realizado com a colaboração do Professor Dr. Hernandes F. Carvalho do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada a Biologia (INCT-INFABIC) da Universidade de Campinas (Unicamp). Sinteticamente,  $9 \times 10^4$  células (silenciadas e não-silenciadas) foram plaqueadas em placas lab-Tek de 2 poços com meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino e armazenadas *overnight* em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  para adesão das células ao plástico da placa. Em seguida, o meio de cultura foi removido e adicionado 2mL de PBS1X. As células foram, então, incubadas com DisBa-01 (10,

100 e 1000nM) e as placas foram examinadas por 30 minutos, usando microscópio confocal LSM 780-NLO Zeiss no microscópio Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss AG, Alemanha). As imagens adquiridas foram documentadas no software ZEN 2009 *Light Edition*.

### **3.11. Análise estatística dos dados**

Os dados provenientes dos experimentos foram comparados e analisados usando análise de variância (ANOVA), com auxílio do programa de estatística *GraphPad Prism*, versão 5.0. Cada experimento foi realizado três vezes em triplicata e todos os valores apresentaram distribuição normal. Em função disso, foi utilizado a análise de variância (ANOVA) one-way e o teste de Dunnett foi aplicado para múltiplas comparações. Em todos os cálculos, foi utilizado o valor crítico de 5%.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Obtenção da desintegrina DisBa-01

A obtenção da proteína DisBa-01 foi realizada como descrito no item 3.2 desta dissertação. Para análise e acompanhamento das etapas de expressão, foram retiradas alíquotas antes da adição de IPTG (T0), após a indução de 3 horas (T3), após a primeira etapa de sonicação (S1) e após a segunda etapa de sonicação (S2).

Durante as fases de purificação em resina de Ni-NTA Sepharose e coluna MonoQ 5/50 GL, também foram retiradas alíquotas para acompanhamento do processo. Essas alíquotas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 15%. Nota-se que somente a purificação da proteína em resina de níquel (Ni – NTA Sepharose) não é suficiente para tornar a proteína livre de impurezas, o que torna o processo de cromatografia em coluna MonoQ necessário (Fig. 17).

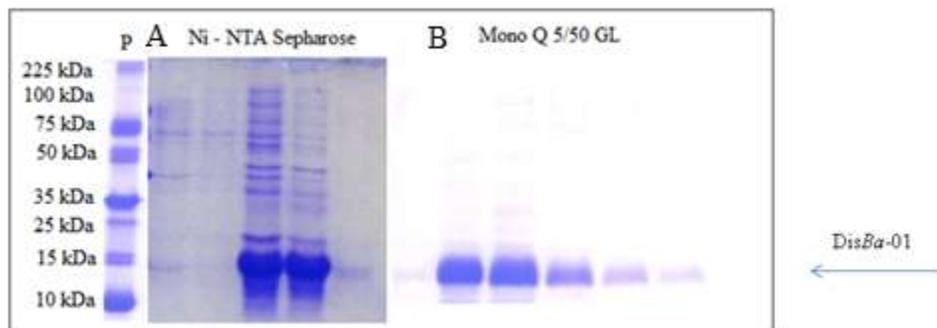


Figura 17 – Análise da purificação da DisBa-01 por SDS-PAGE. P: padrão de massa molecular. O gel A mostra as frações eluídas do processo de cromatografia em resina de níquel (Ni – NTA Sepharose) e o gel B mostra as frações eluídas da cromatografia em coluna MonoQ. A seta indica a banda da proteína de interesse.

As amostras provenientes da purificação em coluna MonoQ foram dialisadas contra água, concentradas para um volume final de aproximadamente 1 mL e submetidas a teste de agregação

plaquetária para confirmação da manutenção da atividade. Em seguida, foram armazenadas a -20° C para posterior utilização em ensaios celulares.

#### 4.2. Silenciamento de RNA (RNAi)

Para determinar o efeito do silenciamento do gene que codifica para a subunidade  $\beta_3$  de integrinas em ensaios biológicos (transmigração em células endoteliais humanas e adesão em células endoteliais humanas sob condição de fluxo), as células MDA-MB-231 foram silenciadas com siRNA/ITGB3 com diferentes concentrações de *primer* de silenciamento e, em seguida, testadas. Os resultados provenientes desta técnica estão representados na tabela IV e figura 19.

##### 4.2.1. Extração de RNA total

A eficiência da técnica de extração de RNA total foi verificada em gel de agarose-formaldeído 1%, o qual mostrou a integridade do RNA pelo aparecimento das bandas correspondentes ao RNA ribossômico 28S, 18S e 5S. Na figura 18, é mostrado também um arraste, característico de demais RNAs com tamanhos variados, presentes em todas as células.

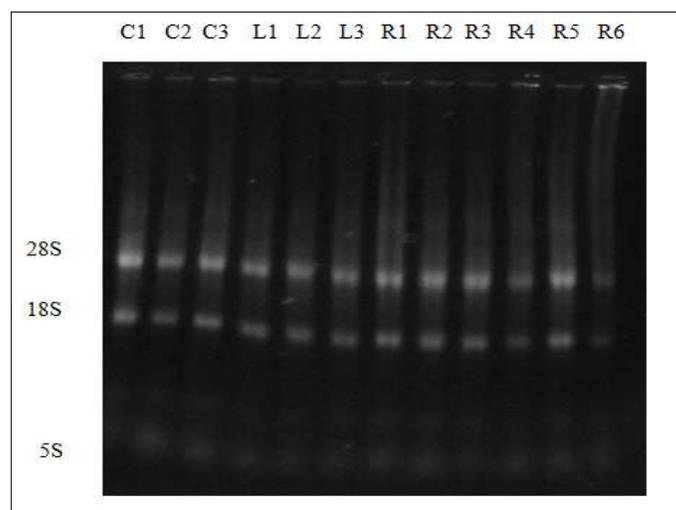


Figura 18 – Amostras de RNA total extraído de células da linhagem MDA-MB-231. C: células Controle; L: Células tratadas com Lipofectamina; R: células silenciadas para  $\beta_3$ .

#### 4.2.2. PCR quantitativo (RT-qPCR)

Após as extrações dos RNA e tratamento destes com DNase, para excluir qualquer DNA genômico, foi realizada a transcrição reversa, para produção de cDNA, como descrito no item 3.6.4. Com estes cDNAs foi realizado qPCR, para análise da expressão de mRNA da subunidade  $\beta_3$ . Esta técnica foi feita com primers específicos para o gene da subunidade  $\beta_3$  de integrinas e para o gene controle (HPRT).

Assim, foram obtidos valores de Ct em duplicata de cada amostra e calculadas suas médias. Da mesma forma, foram obtidos valores de Ct para o gene normalizador HPRT, como mostrado na tabela 4. Nesta tabela também são mostrados valores de  $\Delta Ct$  e suas médias (S),  $\Delta\Delta Ct$ , unidades arbitrárias e suas médias. Esses valores são calculados da seguinte maneira:

- $\Delta Ct = Ct \text{ controle} - Ct \text{ amostra}$
- Média de cada tipo de tratamento (S) =  $\frac{\Delta Ct_1 + \Delta Ct_2 + \Delta Ct_3 + n}{\text{Número de } \Delta Ct}$
- $\Delta\Delta Ct \text{ grupo controle} = \Delta Ct - \text{Média}(S) \Delta Ct \text{ grupo controle}$   
 $\Delta\Delta Ct \text{ grupo lipo} = \Delta Ct - \text{Média}(S) \Delta Ct \text{ grupo controle}$   
 $\Delta\Delta Ct \text{ grupo siRNA} = \Delta Ct - \text{Média}(S) \Delta Ct \text{ grupo lipo}$
- Unidades arbitrárias (UA) =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$
- Médias das unidades arbitrarias =  $\frac{2^{-\Delta\Delta Ct_1} + 2^{-\Delta\Delta Ct_2} + 2^{-\Delta\Delta Ct_3} + n}{\text{Número de UAs}}$

Tabela IV – Cálculo da expressão de mRNA da subunidade  $\beta_3$  obtido pela PCR em tempo real.

Grupo	ITGB3 Média $C_{ts}$	HPRT Média $C_{ts}$	$\Delta C_t$	Media S	$\Delta\Delta C_t$	UA	Média UA
Controle 1	23,51	16,67	6,84	6,99	-0,15	1,10	1,09
Controle 2	23,04	16,24	6,8		-0,19	1,14	
Controle 3	23,13	16,22	6,91		-0,08	1,05	
Lipo 1	23,38	16,07	7,31	7,10	0,32	0,80	0,8
Lipo 3	23,76	16,55	7,21		0,22	0,85	
Lipo 4	23,71	16,33	7,38		0,39	0,76	
siRNA5nM	27,43	16	11,43		4,33	0,04	0,05
siRNA5nM	27,09	15,97	11,12		4,02	0,06	
siRNA10nM	26,25	16,25	10		2,90	0,13	0,11
siRNA10nM	25,96	15,65	10,31		3,21	0,10	
siRNA20nM	26,5	16,52	9,98		2,88	0,13	0,11
siRNA20nM	26,83	16,46	10,37		3,27	0,10	
siRNA30nM	26,57	16,95	9,62		2,52	0,17	0,21
siRNA30nM	26,17	17,16	9,01		1,91	0,26	
siRNA40nM	27,19	16,25	10,94		3,84	0,06	0,05
siRNA40nM	27,97	16,41	11,56		4,46	0,04	

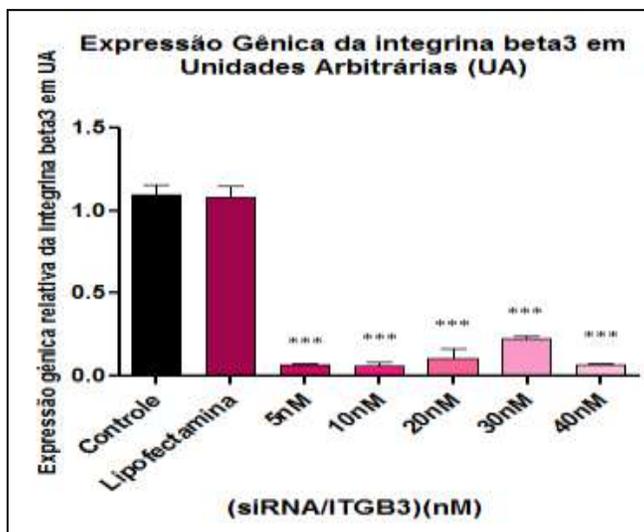


Figura 19 – Representação gráfica dos valores de expressão do mRNA da subunidade  $\beta_3$  em unidades arbitrárias. A análise estatística foi feita utilizando ANOVA one-way seguido do teste de Tukey, sendo  $p < 0,05$  e  $***p < 0,0001$ .

Observa-se na figura 19 que a expressão do mRNA da subunidade  $\beta_3$  apresentou uma redução significativa quando células MDA-MB-231 foram tratadas com quaisquer das concentrações de RNA de interferência. Isso indica que o tratamento com primer de silenciamento foi eficaz e reprimiu a expressão da proteína. Além disso, nota-se também que o tratamento com o agente de transfecção – lipofectamina - não interferiu na expressão da subunidade  $\beta_3$ , indicando que somente o primer específico foi o responsável pela inibição da expressão. Dessa forma, foi escolhida a concentração de 5nM para os ensaios biológicos subsequentes.

Posteriormente a PCR em tempo real, os produtos desta reação foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 2% e os resultados apresentados abaixo. A figura 20A mostra foto de gel de agarose 2% com os produtos de qPCR, a partir de células da linhagem MDA-MB-231, de todos os tratamentos (controle, lipofectamina e siRNA/ITGB3) e *primers* para a amplificação de uma região específica da subunidade  $\beta_3$ . Já a figura 20B mostra os produtos de qPCR, também de todos os tratamentos, mas com *primers* para amplificação de uma região específica para o HPRT. Todas as amostras foram tratadas com DNase para manutenção da qualidade e excluir a possibilidade de interferência de material genômico estranho ao material utilizado.

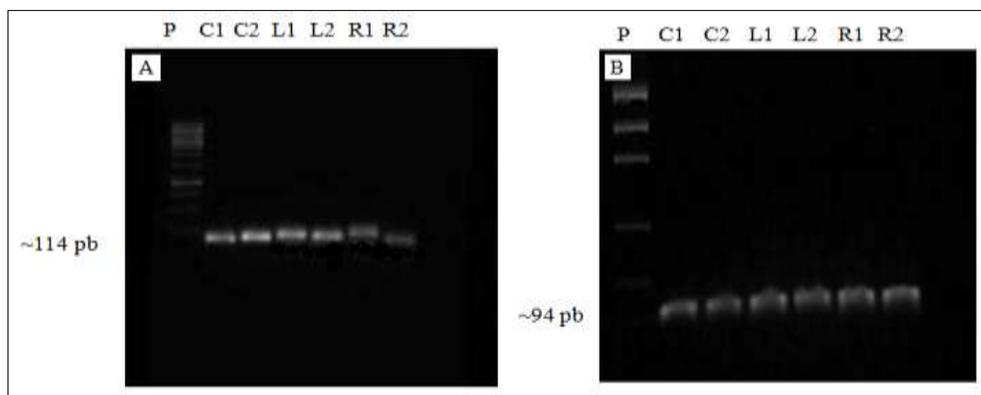


Figura 20 – Fotos representativas dos produtos de RT-PCR da subunidade  $\beta_3$  (A) e HPRT (B) de células da linhagem MDA-MB-231. P: padrão de massa molecular; C: Controle não silenciadas; L: células com lipofectamina; R: células silenciadas.

#### 4.2.3. Cinética do silenciamento do gene codificante para a subunidade $\beta_3$

Após a identificação da concentração ótima de primer de silenciamento, bem como dos produtos de RT-PCR, foi necessário fazer a cinética do silenciamento, ou seja, foi preciso saber o tempo durante o qual as células da linhagem MDA-MB-231 permanecem com a expressão da subunidade  $\beta_3$  reduzida. Dessa forma, o procedimento para o silenciamento, descrito no item 3.6 foi repetido, seguido da extração de RNA total (item 3.6.1) de uma placa retirada aleatoriamente após 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 dias após a transfecção das células com siRNA. Duas placas de Petri contendo células MDA-MB-231 foram mantidas como controle (não transfectadas). Posteriormente à extração de RNA total, o material foi submetido a eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1% para verificação da integridade do RNA. Em seguida, houve a produção do cDNA e qPCR de todas as amostras. A figura 21 representa o gráfico da cinética do silenciamento do gene codificante para a subunidade  $\beta_3$ .

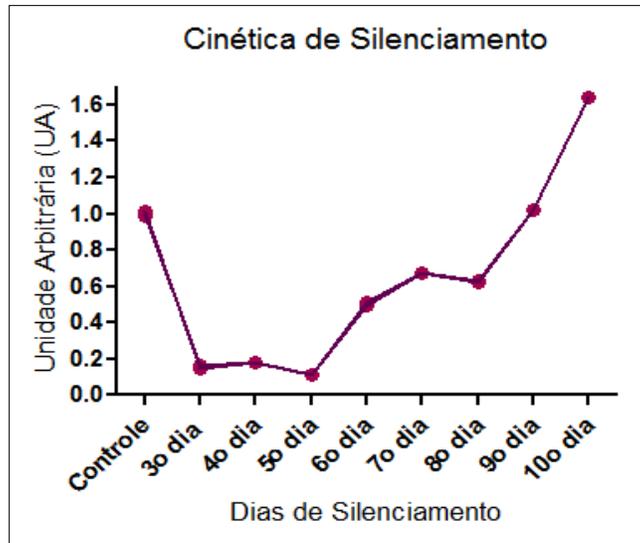


Figura 21 – Cinética do silenciamento do gene que codifica para a subunidade  $\beta_3$  de integrinas em células MDA-MB-231. O procedimento para silenciamento foi realizado como descrito no item 2.6. Após 3 dias do silenciamento, as placas foram retiradas, uma a uma, aleatoriamente, em cada dia, para extração do RNA total e análise por qPCR.

Com este gráfico é possível observar que as células permanecem silenciadas para o gene alvo durante os dois primeiros dias após o tratamento com o *primer* de silenciamento (3º ao 5º dia) e após este período, a expressão da subunidade  $\beta_3$  vai sendo retomada (a partir do 6º dia) e, no 8º dia há um aumento exponencial da expressão do mRNA da subunidade  $\beta_3$ , atingindo níveis muito próximos àqueles referentes às células do grupo controle não silenciadas.

### 4.3. Western blotting

O silenciamento da subunidade  $\beta_3$  foi também confirmado por *western blotting*. Para isso, as células silenciadas foram lisadas conforme descrito no item 3.7. para obtenção das proteínas totais. Em seguida, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, transferidas para membrana de nitrocelulose e incubações com anticorpos, de acordo com o procedimento descrito no item 3.8. Na figura 22 estão representadas as membranas indicando as expressões protéicas da subunidade  $\beta_3$  e da actina, utilizada como controle interno.

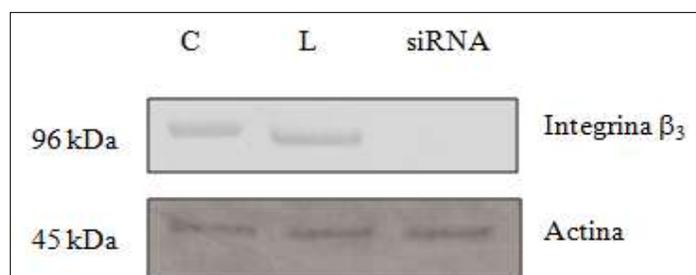


Figura 22 – Expressão da subunidade  $\beta_3$  de integrinas e da actina extraídas de células MDA-MB-231. Amostras resolvidas em gel e poliacrilamida 10% e transferidas para membrana de nitrocelulose. C: células sem nenhum tipo de tratamento; L: células tratadas com lipofectamina; siRNA: células silenciadas com siRNA/ITGB3.

Na figura 22 (porção superior), observa-se ausência de reação com o anticorpo anti  $\beta_3$  nas células silenciadas, confirmando o silenciamento tanto de mRNA como o de proteína. Essa análise é possível em função da utilização do controle interno, o qual permite a inferência de que a expressão das demais proteínas permanece elevada, mesmo nas células que sofreram processo de silenciamento.

#### 4.4. Ensaio de Adesão celular sob condição de fluxo

Há alguns anos foi demonstrada a ação inibitória da *DisBa-01* com relação à adesão estática de células de melanoma murino ao substrato vitronectina (RAMOS *et al.*, 2008). Dando continuidade aos estudos, foram realizados experimentos com o mesmo tipo de células, mas em uma condição de fluxo, mimetizando o fluxo sanguíneo. Nestes novos experimentos, foi demonstrado que a *DisBa-01* foi capaz de inibir a adesão das células MDA-MB-231 ao substrato colágeno tipo I (MONTENEGRO *et al.*, 2012).

Neste presente estudo, foram realizados ensaios com células da linhagem MDA-MB-231, também sob condição de fluxo, mas com um substrato composto de células endoteliais humanas, da linhagem HMEC-1. Além disso, as células tumorais foram divididas em dois grupos: (i)

silenciadas e (ii) não silenciadas e tratadas com diferentes concentrações da desintegrina DisBa-01.

Os resultados demonstram que as células silenciadas apresentaram uma queda na adesão às células endoteliais ( $48,14 \pm 1,50\%$ ), o que indica uma tendência na inibição da adesão conforme ocorre a perda de integrinas na superfície das células (figura 23).

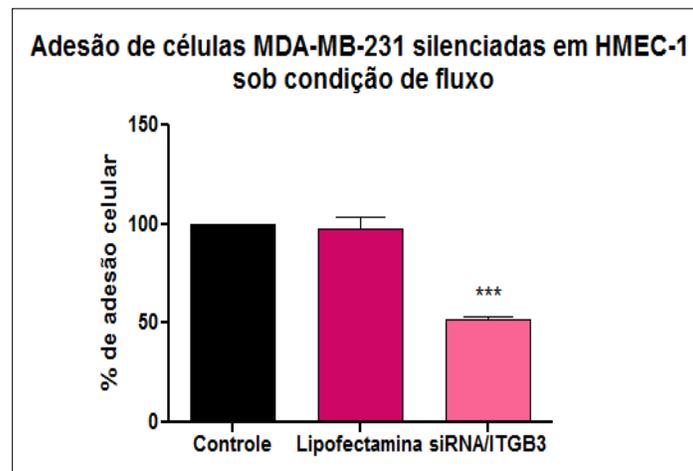


Figura 23 – Inibição da adesão de células MDA-MB-231 silenciadas a células endoteliais humanas (HMEC-1). A análise estatística foi feita utilizando ANOVA one-way seguido do teste de Dunnett, sendo  $p < 0,05$  e  $***p < 0,0001$

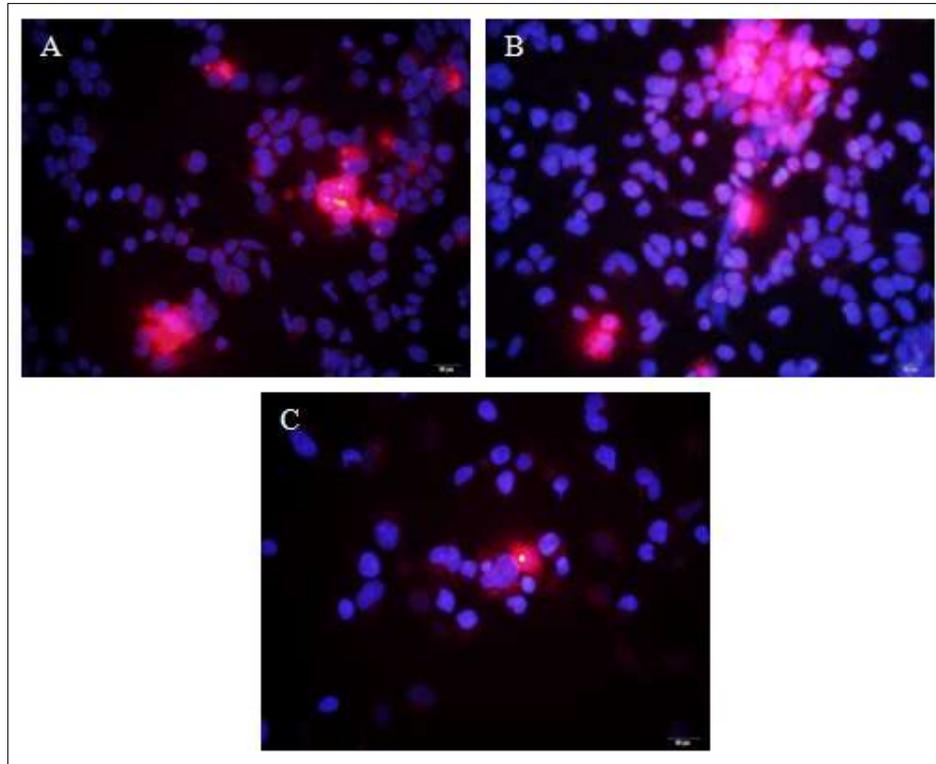


Figura 24 – Fotos representativas da inibição da adesão de células MDA-MB-231 em células endoteliais humanas (HMEC-1). A: células do grupo controle negativo; B: células tratadas com lipofectamina; C: células silenciadas. Aumento de 40X em microscópio óptico de fluorescência. Marcação dos núcleos celulares com DAPI (azul) e do citoplasma celular com Cell Tracker Red (vermelho). Barra equivalente a 20nm

Com relação às células tratadas com diferentes concentrações de *DisBa-01* (10, 100, 500 e 1000nM), quando tratadas com *DisBa-01* na concentração de 10nM, as células tumorais são estimuladas a aderirem nas células endoteliais ( $25,30 \pm 2,97\%$ ). Entretanto, quando tratadas com a desintegrina nas concentrações de 500nM e 1000nM, ocorre uma redução na adesão das células MDA-MB-231 às endoteliais ( $51,48 \pm 2,07\%$  e  $54,64 \pm 3,35\%$ , respectivamente), conforme apresentado na figura 25.

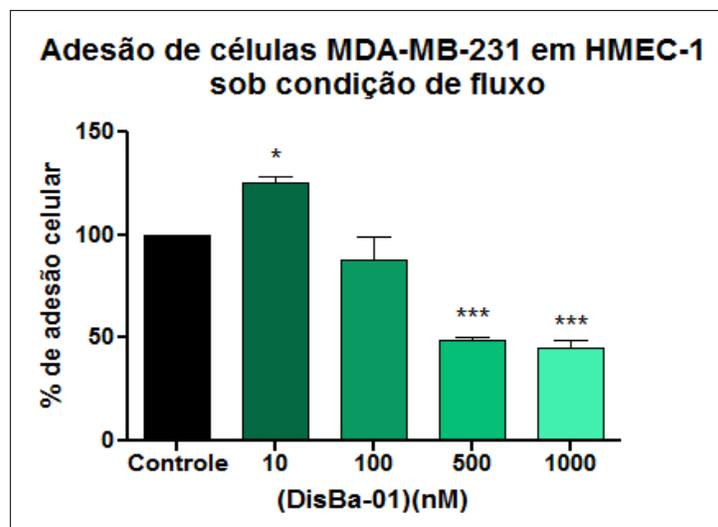


Figura 25 – Inibição da adesão de células MDA-MB-231 em células endoteliais humanas (HMEC-1). A análise estatística foi feita utilizando ANOVA one-way seguido do teste de Dunnett, sendo  $p < 0,05$  e  $***p < 0,0001$ .

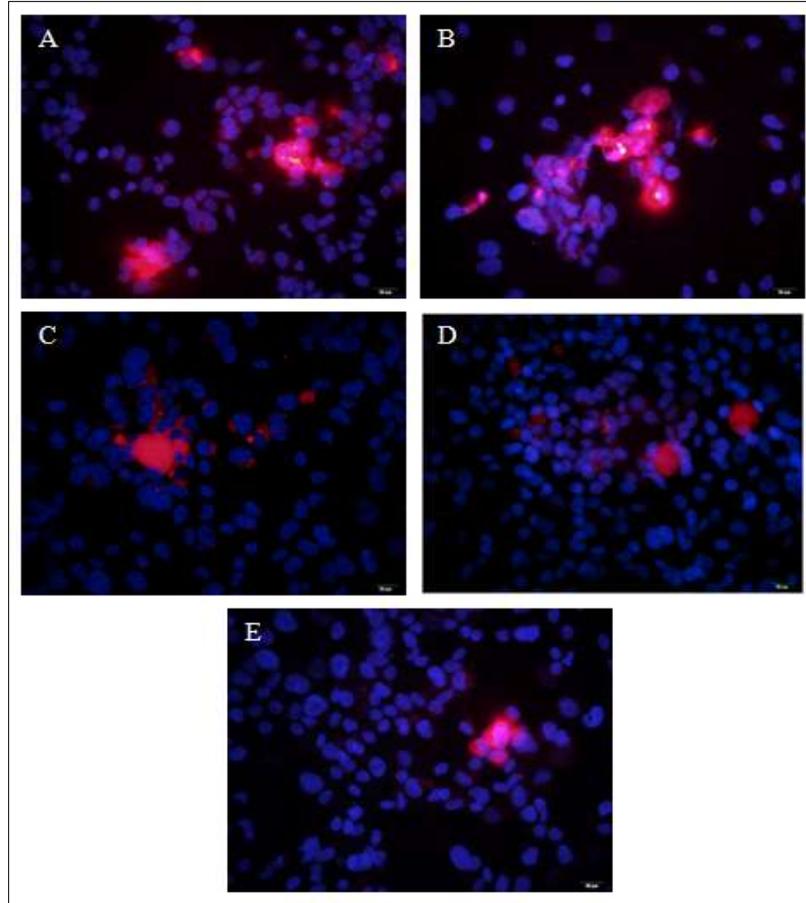


Figura 26 – Imagens representativas da inibição da adesão de células MDA-MB-231 a células endoteliais humanas (HMEC-1) pela DisBa-01 nas concentrações: 0 (A), 10nM (B), 100nM (C), 500nM (D) e 1000nM (E). Aumento de 40X em microscópio óptico de fluorescência. Marcação dos núcleos celulares com DAPI (azul) e do citoplasma celular com Cell Tracker Red (vermelho). Barra equivalente a 20nm.

#### 4.5. Ensaio de Transmigração celular

Neste experimento, foram utilizadas células MDA-MB-231 silenciadas e não silenciadas e tratadas com diferentes concentrações de DisBa-01. Os resultados observados na figura 27 indicam que o silenciamento do gene codificante para a subunidade  $\beta_3$  de integrinas inibiu significativamente a migração das células MDA-MB-231 através das células endoteliais HMEC-1 ( $70,97 \pm 0,57\%$ ), ou seja, houve migração de 29,03% . O tratamento das células com

lipofectamina não provocou diferenças estatísticas significativas nas características das células em relação ao controle.

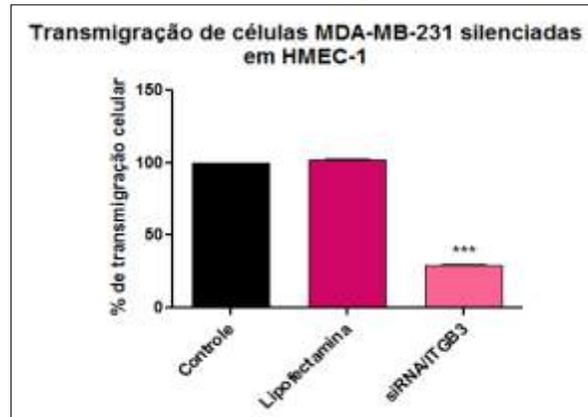


Figura 27 – Efeito do silenciamento do gene codificante da subunidade  $\beta 3$  de integrinas sobre a transmigração de células MDA-MB-231 em células endoteliais humanas (HMEC-1). Os valores com significância estatística foram atribuídos ( $p < 0,05$  e  $***p < 0,0001$ ; ANOVA/Dunnett).

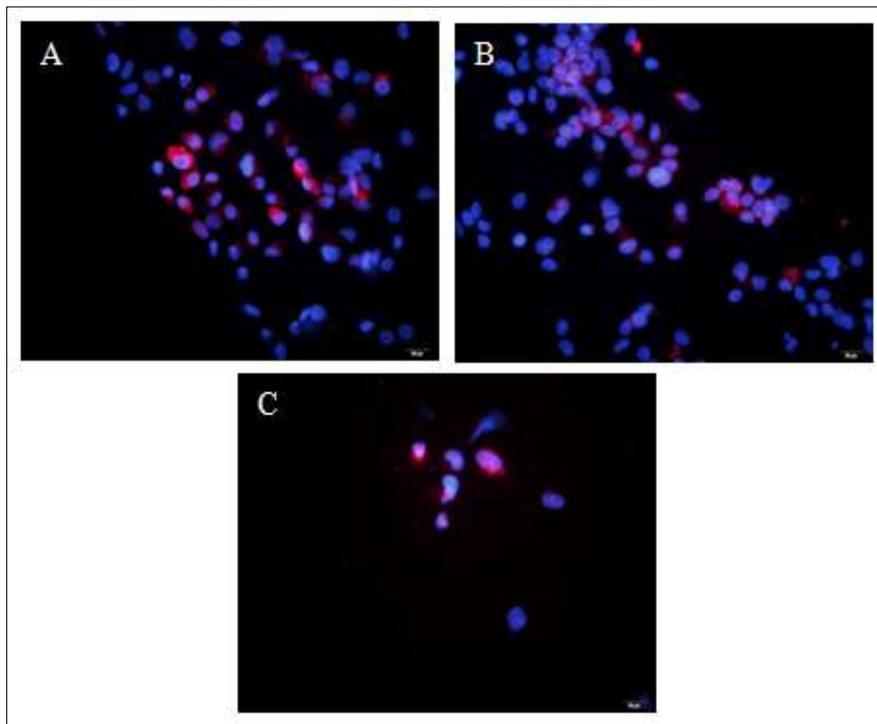


Figura 28 – Fotos representativas do efeito do silenciamento do gene codificante da subunidade  $\beta 3$  de integrinas sobre a transmigração de células MDA-MB-231 em células endoteliais humanas (HMEC-1). A: Células do grupo controle negativo; B: Células tratadas com lipofectamina; C: Células silenciadas. Aumento de 40X em microscópio de fluorescência. Marcação dos núcleos celulares com DAPI (azul) e do citoplasma celular com Cell Tracker Red (vermelho). Barra equivalente a 20nm.

Com relação às células MDA-MB-231 tratadas com a desintegrina DisBa-01, a figura 29 mostra que a proteína apresentou efeito estimulante quando utilizada a concentração de 10nM ( $28,50 \pm 10,08\%$ ) e inibitório quando as células foram incubadas com as duas concentrações mais elevadas (500 e 1000nM), sendo uma diferença de  $24,95 \pm 1,33\%$  para a concentração de 500nM e  $56,95 \pm 2,35\%$  para a concentração de 1000nM.

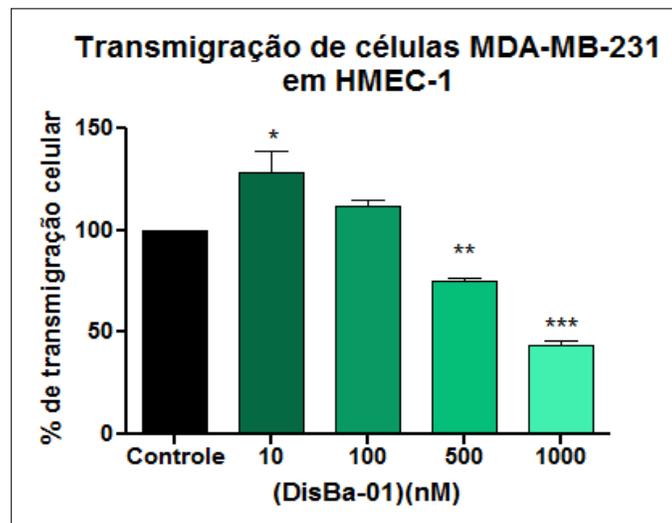


Figura 29 – Efeito da desintegrina DisBa-01 sobre a transmigração de células MDA-MB-231 em células endoteliais humanas (HMEC-1). Os valores com significância estatística foram atribuídos ( $p < 0,05$  e  $***p < 0,0001$ ; ANOVA/Dunnett).

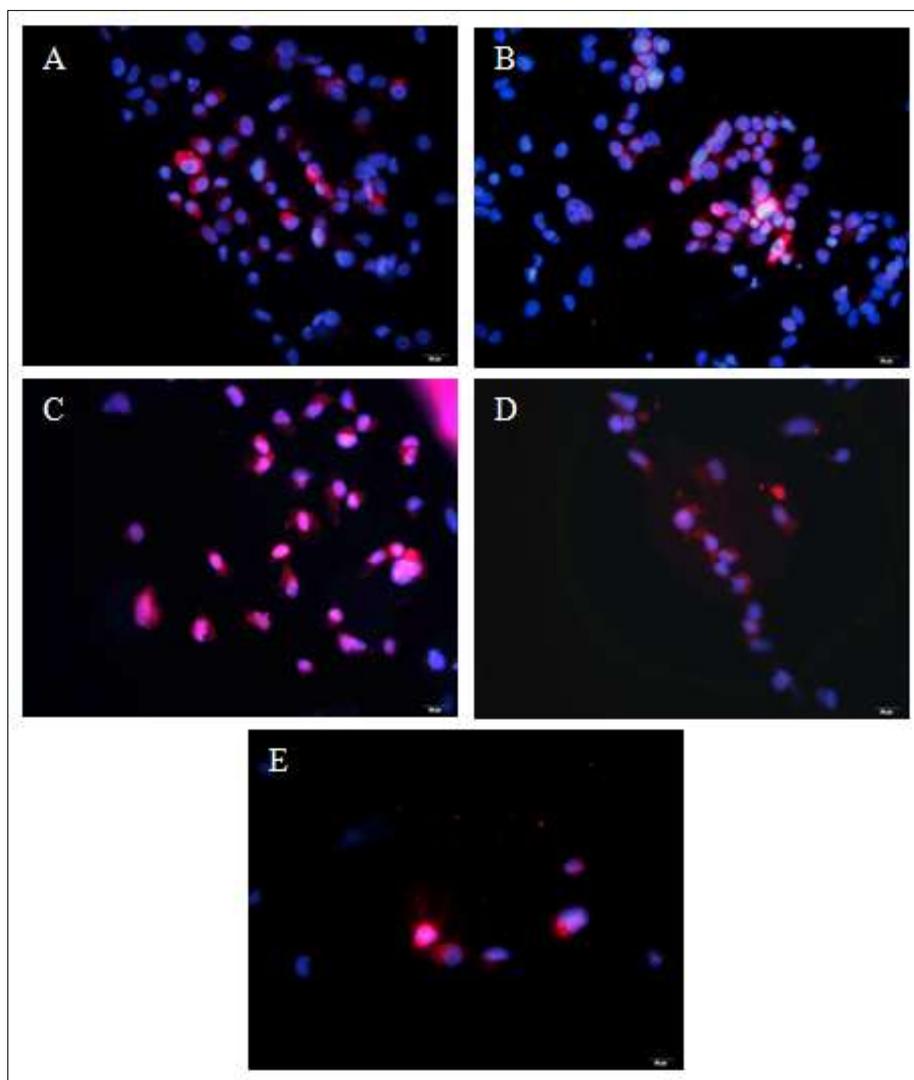


Figura 30 – Fotos representativas da inibição da transmigração de células MDA-MB-231 em células endoteliais humanas (HMEC-1) pela DisBa-01 nas concentrações: 0 (A), 10nM (B), 100nM (C), 500nM (D) e 1000nM (E). Aumento de 40X em microscópio óptico de fluorescência. Marcação dos núcleos celulares com DAPI (azul) e do citoplasma celular com Cell Tracker Red (vermelho). Barra equivalente a 20nm.

#### 4.6. Ensaio de ligação celular por *Time lapse*

A atividade de ligação da desintegrina DisBa-01 às células da linhagem MDA-MB-231 foi investigada por *time lapse*, ou seja, as células foram escaneadas em intervalos de tempo (30 segundos) e, posteriormente foi possível a visualização em formato de vídeo, da interação entre a desintegrina, em diferentes concentrações, e as células. As desintegrinas foram previamente

marcadas com o fluoróforo Alexa Fluor 555, como descrito no item 3.5. A figura 31 representa o momento em que a DisBa-01, em diferentes concentrações, interage com as células tumorais não silenciadas e transfectadas com GFP. Com estas imagens pode-se observar uma maior interação da proteína DisBa-01 com as células MDA-MB-231, na concentração de 1000nM, não sendo possível a visualização de nenhuma interação quando as células são incubadas com concentrações diferentes desta (1000nM) de proteína. Apesar dessas observações, não é possível afirmar que essa interação ocorra somente quando a proteína encontra-se na maior concentração, uma vez que, em diferentes ensaios biológicos houveram respostas celulares diante de administração de concentrações diferentes de DisBa-01, como mostrado por Montenegro e colaboradores (2012). Além disso, as imagens mostram também alterações na morfologia celular, a qual pode ser resultante da interferência do laser emitido pelo microscópio multifóton.

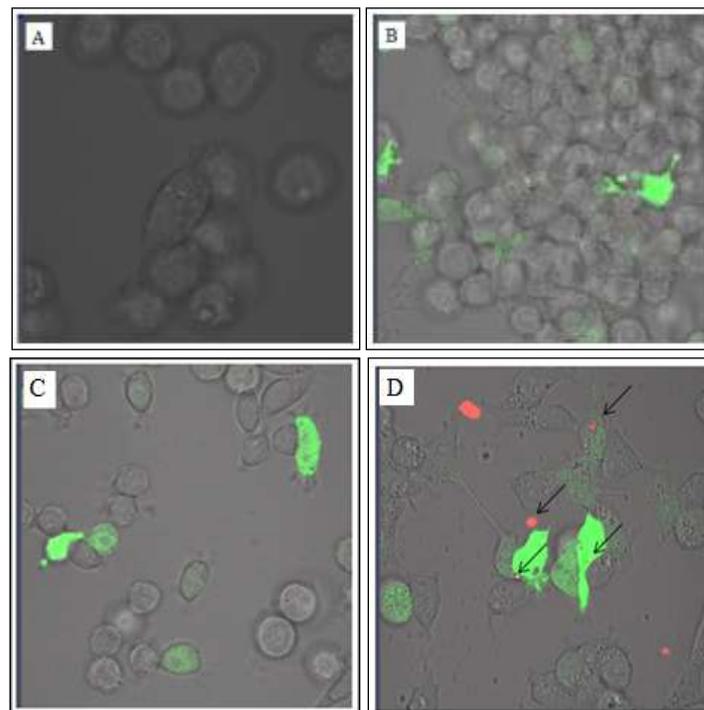


Figura 31 – Fotos representativas da interação entre a desintegrina DisBa-01 com células MDA-MB-231 não silenciadas e transfectadas com GFP. Imagens no tempo de 2 minutos após adição da desintegrina marcada com Alexa Fluor 555 nas seguintes concentrações: 0 (A); 10nM (B), 100nM (C) e 1000nM (D). Aumento de 40X.

A figura 32 mostra uma comparação entre as interações da DisBa-01, em diferentes concentrações (10, 100 e 1000nM) com células não-silenciadas e células silenciadas, ambas sem GFP. Pode-se observar que na concentração de 1000nM (figura 32 E e F), a DisBa-01, embora apresente interação com as células MDA-MB-231, a proteína não interage com as células da mesma linhagem que sofreu processo de silenciamento da subunidade  $\beta_3$  de integrinas, o que pode indicar uma possível ligação mais específica da DisBa-01 com a integrina  $\alpha_v\beta_3$ .

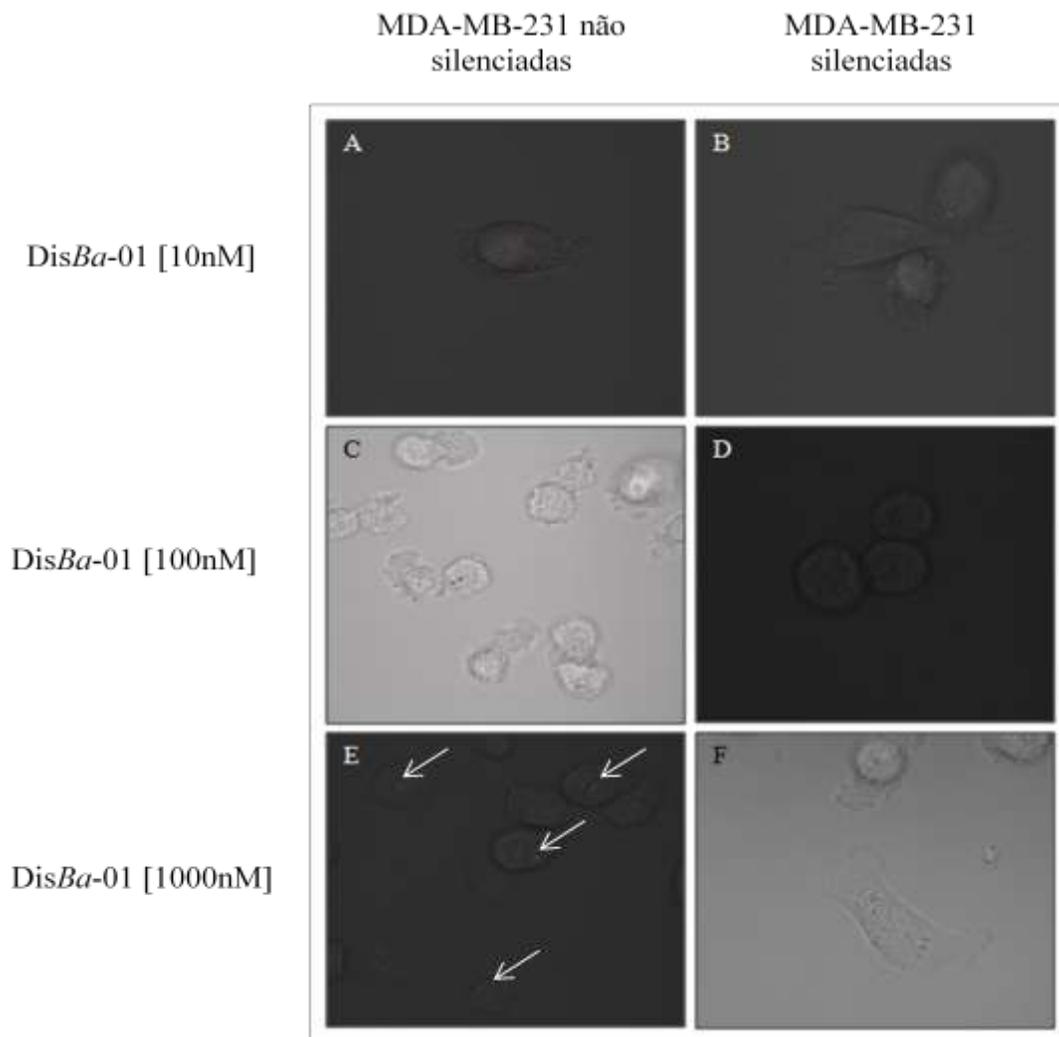


Figura 32 – Fotos representativas da interação entre desintegrina DisBa-01 com células MDA-MB-231. Imagens no tempo de 2 minutos após adição da desintegrina. A seta indica as vesículas intracelulares contendo a DisBa-01 Aumento de 40X.

## 5. DISCUSSÃO

A integrina  $\alpha_v\beta_3$  tem sido amplamente estudada e diversas pesquisas mostram seu envolvimento nos processos de invasão e metástase (ALPHONSO & ALAHARI, 2009; LIU, H. *et al.*, 2012). Trata-se de um receptor de membrana celular que é requerido para a manutenção e estabelecimento das células tumorais, uma vez que a integrina está intimamente relacionada ao VEGF (MAHABELESHWAR, *et al.*, 2007). De maneira semelhante, pesquisadores tem demonstrado que a utilização de proteínas do veneno de serpentes são fontes de biomoléculas capazes de apresentar efeitos sobre as células tumorais, o que lhes confere características de potenciais fontes de moléculas bioativas na terapia anti-metastática. Dentre tais moléculas, a DisBa-01 tem apresentado resultados significativos no que diz respeito ao seus efeitos inibitórios nas etapas de disseminação metastática (MONTENEGRO, *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2008; RIBEIRO, J.U. dados não publicados).

A tecnologia do RNAi, uma descoberta relativamente recente (BARBOSA & LIN, 2004; SOUZA *et al.*, 2007; SHREY *et al.*, 2009), fornece um novo leque de opções que amplia a visão e o estudo funcional de proteínas. Assim, neste trabalho foi realizado o silenciamento da subunidade  $\beta_3$  de integrinas nas células de câncer de mama, o que permitiu o estudo do efeito que a integrina  $\alpha_v\beta_3$  apresenta no processo de adesão das células tumorais (MDA-MB-231) às células endoteliais para a invasão de um novo sítio metastático, assim como seu efeito na etapa de migração das células tumorais através das células endoteliais. Além disso, para avaliar a interação da integrina  $\alpha_v\beta_3$  com a DisBa-01, a proteína foi produzida em nosso laboratório e obtida com pureza e quantidades satisfatórias para a realização de ensaios biológicos.

Referente ao silenciamento, foram testadas diferentes concentrações de oligos de silenciamento para identificação da melhor concentração para que os ensaios biológicos fossem

realizados. A confirmação da técnica de RNAi foi realizada por qPCR e, posteriormente, validada por *western blotting*. Todas as concentrações de siRNA testadas promoveram o silenciamento do mRNA para a subunidade  $\beta_3$  em células MDA-MB-231, quando comparadas com as células controle e célula tratadas com lipofectamina, descartando a hipótese do agente transfectante causar alterações na expressão do mRNA em questão. Apesar de todas as concentrações terem sido eficazes no silenciamento, foi selecionada a concentração de 5nM para otimização do material e continuidade dos ensaios biológicos. Parâmetros semelhantes a estes, ou seja, silenciamento eficiente e com concentrações baixas de siRNA, foram realizados por TUCCI e colaboradores (2009), que também utilizaram a lipofectamina como agente transfectante, porém utilizaram células de mieloma. CHEN, e colaboradores (2009) também realizaram experimentos com parâmetros parecidos com os obtidos neste trabalho, porém com células de câncer de ovário.

Para confirmar a redução da expressão desta subunidade, foi realizado também o *western blotting* com anticorpos contra a subunidade  $\beta_3$  e contra a proteína actina, como proteína constitutiva. A técnica de silenciamento transiente foi eficaz para a subunidade  $\beta_3$ , pois a célula apresentou redução nos níveis desta proteína, quando comparado aos níveis de actina, da mesma célula.

No ensaio em que foi simulada a condição encontrada no interior de vasos sanguíneos (5 dynes/cm<sup>2</sup> – circulação venosa; BARNES, J.M. *et al.*, 2012) com bomba peristáltica e células tumorais humanas, foi verificada a inibição da adesão das células MDA-MB-231 à monocamada de células endoteliais, quando tratadas com concentrações de 500 e 1000nM de DisBa-01. Este fato sugere o bloqueio da integrina  $\alpha_v\beta_3$  pela desintegrina, o que poderia interferir na ligação destas integrinas àquelas presentes nas células endoteliais, assim como na interação com

plaquetas, gerando uma barreira aos receptores de membrana e dificultando a adesão das células tumorais às endoteliais. Estudos realizados por Ramos e colaboradores (2008) mostram que células de melanoma murino, quando incubadas com DisBa-01, apresentam uma redução na interação com plaquetas, com uma menor formação de conjugados célula-plaquetas-fator de von Willebrand/fibrinogênio, corroborando a sugestão do bloqueio a integrina pela DisBa-01. Cominetti e colaboradores (2009), utilizando este mesmo sistema de fluxo e mesmo tipo celular, porém com a proteína ADAM9D, observaram a inibição da adesão destas células ao colágeno tipo I. De acordo com os pesquisadores, a ADAM9D apresenta efeito inibitório sobre a adesão de plaquetas sobre o colágeno, mas não inibe a agregação plaquetária induzida por colágeno tipo I, o que sugere o bloqueio da integrina  $\alpha_v\beta_3$  das células tumorais pela ADAM9D.

Em adição a estes achados, o silenciamento da integrina  $\beta_3$  também inibiu a adesão destas células às HMEC-1. Esse resultado pode indicar a ligação da DisBa-01 à  $\alpha_v\beta_3$ , predominantemente, já que, apesar da presença de demais integrinas na superfície celular (Ribeiro 2009, dados não publicados), a inibição da adesão às células endoteliais ocorreu de forma significativa. Estudos prévios de Ramos e colaboradores (2008) mostraram que a desintegrina deste presente trabalho interage com a integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Estes resultados sugerem que a integrina em questão seja uma das moléculas fundamentais para a etapa de extravasamento das células tumorais, além de interferir também nas etapas de adesão, migração, invasão e proliferação (MOROZEVICH, G.E. *et al.*, 2004; TUCCI, M. *et al.*, 2009; CHEN, J. *et al.*, 2009; GRASHOFF, C. *et al.*, 2010).

Em contraposição, a concentração de 10nM de DisBa-01 utilizada nas células MDA-MB-231, favoreceu a adesão destas células às endoteliais. Provavelmente, devido à baixa concentração de desintegrina, não houve o bloqueio da interação entre a  $\alpha_v\beta_3$  e as integrinas das

células endoteliais. Além disso, a baixa concentração pode ter estimulado as células de tal forma que o tipo de integrinas presentes na superfície celular precisou ser alterado diante do novo ambiente no qual as células se encontravam (ALPHONSO & ALAHARI, 2009).

Além da adesão às células endoteliais, os processos de extravasamento e metástase, apresentam também uma etapa de migração transendotelial, na qual as células tumorais migram através da monocamada de células do vaso sanguíneo. Esta migração transendotelial faz com que as células endoteliais tenham uma alteração dos receptores de membrana e, assim, há a colonização do nicho metastático (MIERKE *et al.*, 2008). Neste trabalho observou-se a redução da transmigração de células da linhagem MDA-MB-231 quando estas foram previamente incubadas com 500nM e 1000nM de DisBa-01. Este resultado sugere, novamente, um bloqueio da integrina  $\alpha_v\beta_3$ , o que dificulta a migração das células tumorais através das células endoteliais (MA, D. *et al.*, 2011). Além disso, esta integrina também está relacionada ao receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-2) e, em um estudo de Lee e colaboradores (2002), foi observado que o VEGF gera uma retração das células endoteliais cerebrais, ocasionando, assim, uma maior permeabilidade, facilitando a migração transendotelial de células tumorais. Neste sentido, o bloqueio da integrina ocasiona uma perda da ativação do receptor de VEGFR-2 e, conseqüentemente, na perda de sinalização através do VEGF, resultando em uma diminuição da permeabilidade celular (MAHABELESHWAR, *et al.*, 2007; LEE, *et al.*, 2002; MONTENEGRO *et al.*, 2012).

Este mesmo raciocínio pode ser aplicado ao resultado observado com o silenciamento da subunidade  $\beta_3$  de integrinas. Com este experimento nota-se a redução da migração transendotelial pelas células tumorais de mama indicando que a ausência da integrina  $\alpha_v\beta_3$  acarreta em uma série de eventos que culminam, dentre outros, na inibição da migração de

células tumorais através das células dos vasos sanguíneos e, conseqüentemente, na redução da colonização de um novo sítio metastático (FELDING-HABERMANN, B. *et al.*, 2003; BAUER, K. *et al.*, 2007; DESGROSELIER, J. S. *et al.*, 2009).

Outro fator que corrobora essas observações está relacionado ao estudo realizado por Liu e colaboradores (2012), no qual foi investigada a ação do proto-oncogene MYC no processo metastático. De acordo com os pesquisadores, o gene acima referido age, além de outras vias de sinalização, através da integrina  $\alpha_v\beta_3$ , de forma que a ausência deste heterodímero acarreta na redução da metástase *in vivo*. Além disso, este mesmo estudo observou que ambos silenciamentos independentes, ou seja, somente o silenciamento da subunidades  $\alpha_v$  ou somente o da  $\beta_3$  resulta na diminuição dos níveis do heterodímero completo e esta diminuição está diretamente relacionada à redução de metástases em camundongos.

Em adição aos experimentos desenvolvidos para estudar os efeitos da desintegrina e do silenciamento gênico, foi realizado também ensaio de ligação com visualização pela técnica de *time lapse* (DEWAN, M.A., SWAMY, M.N. & AHMAD, M.O., 2011). Diversos são os estudos que envolvem diagnósticos através de imagens, entretanto aqueles que se utilizam da técnica de *time lapse* estão mais relacionados à investigação dos processos de migração e invasão celular, *in vitro* e *in vivo* (FIOLKA, R. *et al.*, 2012; ISHIDO, M. & KASUGA, N., 2012; FORSLUND, E. *et al.*, 2012).

Neste experimento, células tumorais foram incubadas com a desintegrina marcada com fluoróforo e imagens sequenciais foram capturadas para o entendimento da dinâmica da interação entre a desintegrina e as células MDA-MB-231. Os resultados destes ensaios mostram que houve maior sinal da ligação entre as células tumorais com as desintegrinas quando esta se apresentava mais concentrada (1000nM), diferentemente das outras concentrações, as quais não

mostraram sinal visível de interação com as células MDA-MB-231 transfectadas com GFP. Além disso, a desintegrina pode ser visualizada no interior de vesículas no citoplasma das células. Em estudos anteriores, com a utilização de outra desintegrina proveniente do veneno bruto de *Rhinocerophis alternatus*, a alternagina-C, foi possível visualizar a interação com células de câncer de mama, porém tal desintegrina permaneceu na superfície celular (dados não publicados) e, por apresentar motivo adesivo ECD, a sua interação com as células se faz, prioritariamente, com as integrinas  $\alpha_2\beta_1$  (SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. *et al.*, 2005).

Com relação à interação da desintegrina com as células MDA-MB-231 silenciadas, a mostra a comparação desta interação com células silenciadas e não silenciadas. Nota-se que o grupo de células que não passou pelo tratamento de RNAi apresenta interação com a desintegrina, quando a proteína está mais concentrada enquanto que as células, cuja integrina  $\alpha_v\beta_3$  está ausente na superfície, não mostra interação com a desintegrina. Essas observações são sustentadas por Ramos e colaboradores (2008), no que diz respeito à ligação entre a DisBa-01 e a subunidade  $\beta_3$ , predominantemente. Neste estudo, os pesquisadores observaram, através de análise de ressonância completa, uma maior interação entre a desintegrina e o receptor de membrana em detrimento das demais integrinas presentes na superfície celular.

Dessa forma, os efeitos da DisBa-01 observados em células da linhagem MDA-MB-231 permitem a utilização desta molécula em modelos *in vivo*, mais especificamente no estudo de tumores de mama, para uma avaliação mais aprofundada no que diz respeito à utilização desta molécula como um composto bloqueador da integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Além disso, os dados observados com o silenciamento da integrina em questão são corroborados por estudos que envolvem a supressão de vias moleculares que tem participação do disparo de cascatas que resultam em metástase (Liu, H. *et al.*, 2012). Entretanto, investigações mais aprofundadas com relação aos

seus efeitos sobre outras linhagens celulares são necessárias, já que a desintegrina não apresenta interação exclusiva com a  $\alpha_v\beta_3$  e esta integrina não está presente somente em células da linhagem MDA-MB-231.

## 6. CONCLUSÕES

Com os dados obtidos neste trabalhos, podemos concluir que:

∞ A integrina  $\alpha_v\beta_3$  está envolvida na adesão das células MDA-MB-231 a células endoteliais, sob condição de fluxo;

∞ A integrina  $\alpha_v\beta_3$  é essencial para a migração transendotelial de células MDA-MB-231;

∞ A DisBa-01 mostra-se eficaz na inibição da transmigração celular tumoral.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

ALBERTS, *et al.* **Molecular Biology of the Cell**. 5<sup>a</sup> Ed. Porto Alegre, Artmed. p.1172, 2008.

ALPHONSO, A. & ALAHARI, S. K. Stromal cells and integrins: conforming to the needs of the tumor microenvironment. **Neoplasia**, v. 11, n. 12, p. 1264-1271, 2009.

ARSHAD, F. *et al.* Blood-Brain Barrier integrity and breast cancer metastasis to the brain. **Patholog. Res. Int.** v.2011, p 1-12, 2011.

BARBOSA, A.S. & LIN, C.J. Gene silencing with RNA interference: a novel tool for the study of physiology and pathophysiology of adrenal cortex. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, 48 (5): 612-619. 2004.

BAUER, K. *et al.* Expression profiling reveals genes associated with transendothelial migration of tumor cells: a functional role for  $\alpha v \beta 3$  integrin. **Int J Cancer.**, 121(9):1910-8. 2007.

BARNES, J.M., NAUSEEF, J.T. & HENRY, M.D. Resistance to Fluid Shear Stress Is a Conserved Biophysical Property of Malignant Cells. **PlosOne**.v 7(12). 2012.

BARCZYK, M., CARRACEDO, S. & GULLBERG, D. Integrins. **Cell Tissue Res.** 339:269–280. 2010.

BERRIER, A.L.; YAMADA, K.M. J. Cell-matrix adhesion. **Cell. Physiol.** 213: 565-573, 2007.

BINDRA, V.K. & SIKKA, P. Newer antithrombotic drugs. **Indian Journal of Critical Care Medicine**. vol 14, 4: 188-195, 2010.

BORGES-MARTINS, M.; ALVES, M.L.M.; ARAUJO, M.L. de; OLIVEIRA, R.B. de & ANÉS, A.C. 2007. **Répteis** p. 292-315. *In*: BECKER, F.G.; R.A. RAMOS & L.A. MOURA (orgs.)

Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 385.

BROOKS, P. C. *et al.* Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. **Cell**. 79, 1157-1164, 1994a.

BROOKS, P.C., CLARK, R.A.F. e CHERESH, D.A. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. **Science**, v. 264, pp.569-571, 1994b.

CALVETE, J. J. *et al.* Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v.45, n.8, p.1063-1074. 2005.

CAO, Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 33, n. 4, p. 357-369, 2001.

CARDOSO, K.C. *et al.* A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternates* (urutu). **BMC Genomics**. 11:605. 2010.

CHEN, J. *et al.* Integrin  $\beta 3$  down-regulates invasive features of ovarian cancer cells in SKOV3 cell subclones. **J Cancer Res Clin Oncol.**, 135:909–917. 2009.

CHIA *et al.* Inhibition of metastasis, angiogenesis, and tumor growth by Chinese herbal cocktail Tien-Hsien Liquid. **BMC Cancer**, 10:175, 1-16, 2010.

COMINETTI, M. R. *et al.* Inhibition of platelets and tumor cell adhesion by the disintegrin domain of human ADAM9 to collagen I under dynamic flow conditions. **Biochimie**. 91, pp. 1045-1052. 2009.

COPPOLINO, M. G.; DEDHAR, S. Bi-directional signal transduction by integrin receptors. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v. 32, pp. 171-188, 2000.

DELLA-CASA, M. S *et al.* Insularin, a disintegrin from Bothrops insularis venom: inhibition of platelet aggregation and endothelial cell adhesion by the native and recombinant GST-insularin proteins. **Toxicon**, v.57, n.1, p.125-133, 2011.

DESGROSELLIER, J. S., *et al.* Integrin  $\alpha\beta3$ -c-Src oncogenic unit promotes anchorage-independence and tumor progression. **Nature Med.** 15, 1163–1169 (2009).

DESGROSELLIER, J. S.; CHERESH, D. A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. **Nat Rev Cancer**, v.10, n.1, p.9-22, 2010.

DEWAN, M.A., SWAMY, M.N. & AHMAD, M.O. Tracking biological cells in time-lapse microscopy: an adaptive technique combining motion and topological features. **IEEE Trans Biomed Eng.**, 58(6):1637-47. 2011.

ELLIS, L.M. & FIDLER, I.J. Angiogenesis and Metastasis. **Eur. J. Cancer.**, v. 32, n. 14, p. 2451-2460, 1996.

FELDING-HABERMANN, B. *et al.* Activated integrin  $\alpha\beta3$  cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci.**,100(16):9482-7. 2003.

FENWICK *et al.* Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera Bothrops, Bothriopsis and Bothrocophias (Serpentes: Viperidae). **Zoo. J. Linn. Soc.**, v 156, p. 617-64 , 2009.

FIOLKA, R. *et al.* Time-lapse two-color 3D imaging of live cells with doubled resolution using structured illumination. **Proc Natl Acad Sci.**,109(14):5311-5. 2012.

FISCHELL, T. *et al.* Eptifibatide: The evidence for its role in the management of acute coronary syndromes. **Core Evidence.** 4: 49-65, 2009.

FORSLUND, E. *et al.* Novel Microchip-Based Tools Facilitating Live Cell Imaging and Assessment of Functional Heterogeneity within NK Cell Populations. **Front Immunol.**,3:300. 2012.

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, n.12, p.3016-3030, 2008.

GAN, Z. R. *et al.* Echistatin. A potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper, *Echis carinatus*. **J Biol Chem**, v.263, n.36, p.19827-19832, 1988.

GIANCOTTI, F.G. & RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. *Science*, 285: 1028-1031, 1999.

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

GOMES, N. *et al.* Breast adenocarcinoma cell adhesion to the vascular subendothelium in whole blood and under flow conditions: Effects of  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_{Ib}\beta_3$  antagonists. **Clinical & Experimental Metastasis**, 21: 553–561, 2004.

GONZALES-RIVERA, A. *et al.* Epidemiologia de las mordeduras por serpiente. Su simbolismo. **Acta Pediátrica de México**, v. 30, n. 3, p. 182-191, 2009.

GOULD, R. J. *et al.* Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.195, n.2, p.168-171, 1990.

GRASHOFF, C. *et al.* Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. **Nature.**, 466(7303): 263–266. 2010.

HARBURGER, D.S. & CALDERWOOD, D.A. Integrin signalling at a glance. **J. Cell Sci.** 122: 159-163, 2009.

HEHLGANS, S.; HAASE, M.; CORDES, N. Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1775: 163-180, 2007.

HOOD, J. D. & CHERESH, D. A. Role of integrins in cell invasion and migration. **Nat. Rev. Cancer** 2, 91-100, 2002.

HOLMGREN, L. O'REILLY, M.S. e FOLKMAN, J. Angiotastin induces and sustain dormancy of human primary tumors in mice. **Nat. Med.** v. 2, pp. 689-692, 1996.

HOLLY, S.P.; LARSON, M.K.; PARISE, L.V. Multiple roles of integrins in cell motility. **Experimental Cell Research**, 261: 69-74, 2000.

HONG, S. Y. *et al.* The snake venom disintegrin salmosin induces apoptosis by disassembly of focal adhesions in bovine capillary endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.302, n.3, p.502-508, 2003.

HYNES, R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, 110, 673-687, 2002.

HYNES, R.O. The emergence of integrins: a personal and historical perspective. **Matrix Biol.**, v. 23, n. 6, p. 333-340, 2004.

ISHIDO, M. & KASUGA, N. In Vivo Real-Time Imaging of Exogenous HGF-Triggered Cell Migration in Rat Intact Soleus Muscles. **Acta Histochem Cytochem.**,45(3):193-9. 2012.

JAIN, S., HARRIS, J & WARE, J. Platelets Linking Hemostasis and Cancer. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 30:2362-2367. 2010.

JOYCE, J.A. & POLLARD, J.W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nat Rev Cancer.** Vol. 9(4): 239–252. 2009.

KANG, I. C. *et al.* Suppressive mechanism of salmosin, a novel disintegrin in B16 melanoma cell metastasis. **Biochem Biophys Res Commun**, v.275, n.1, p.169-173, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4". **Nature** , 227: 680-685, 1970.

LAUBLI, H. & BORSIG, L. Selectins as mediators of lung metastasis. **Cancer Microenvironment.** 3:97–105. 2010.

LE, *et al.* The Roles of MicroRNAs in the Cancer Invasion-Metastasis Cascade. **Cancer Microenvironment.** 3:137–147, 2010.

LEE, T. H. *et al.* Vascular endothelial growth factor modulates neutrophil transendothelial migration via up-regulation of interleukin-8 in human brain microvascular endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 277, no. 12, pp. 10445–10451, 2002.

LIVIAK, K.J. & SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-DDC(T)</sup> **Method. Methods**, 25 (4): 402-408, 2001.

LIU, Y. *et al.* The Roles of Platelet GPIIb/IIIa and  $\alpha v\beta 3$  Integrins during HeLa Cells Adhesion, Migration, and Invasion to Monolayer Endothelium under Static and Dynamic Shear Flow. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v. 2009, pp. 1-9, 2009.

LIU, H. *et al.* MYC suppresses cancer metastasis by direct transcriptional silencing of  $\alpha v$  and  $\beta 3$  integrin subunits. **Nature Cell Biology**. v. 14, n. 6. 2012.

LORGER *et al.* Activation of tumor cell integrin  $\alpha v\beta 3$  controls angiogenesis and metastatic growth in the brain. **PNAS**. Vol 106, n. 26, pp. 10666-10671, 2009.

MA, D. *et al.* A novel family of RGD-containing disintegrin (Tablysin-15) from the salivary gland of the horsefly *Tabanus yao* targets  $\alpha IIb\beta 3$  or  $\alpha v\beta 3$  and inhibits platelets aggregation and angiogenesis. **Thromb Haemos.**, v. 105, p. 1-14. 2011.

MAHABELESWAR, G.H. *et al.* Mechanisms of integrin-vascular endothelial growth factor receptor cross-activation in angiogenesis. **Circ Res**. 101(6): 570–580. 2007.

MARCINKIEWICZ, C. *et al.* Significance of RGD loop and C-terminal domain of echistatin for recognition of  $\alpha IIb\beta 3$  and  $\alpha(v)\beta 3$  integrins and expression of ligand-induced binding site. **Blood**, 90, 1565-1575, 1997.

McLANE, M. A.; MARCINKIEWICZ, C.; VIJAY-KUMAR S. Viper venom disintegrins and related molecules. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 219(2), 109-119, 1998.

MIERKE, C.T. *et al.* Breakdown of the endothelial barrier function in tumor cell transmigration. **Biophys. J.**, v.94, p. 2832-2846, 2008.

MITRA, S.K.; HANSON, D.A.; SCHLAEPFER, D.D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. **Nature Reviews**. 6: 56-68, 2005.

MIZEJEWSKI, G. J. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. **Proc.Soc.Exp.Biol.Med.**, v. 222, n. 2, p. 124-138, 1999.

MOHLA, S & WITZ, I.P. **Cancer Microenvironment**. 3:1–5, 2010.

MONTENEGRO, C.F. *et al.* Blocking  $\alpha_v\beta_3$  integrin by an rgd disintegrin impairs vegf signaling in endothelial cells and inhibits tumor cell migration. **Biochimie**. v.94, p.1812-1820. 2012.

MOROZEVICH, G.E. *et al.* A Role for Integrin  $\alpha_v\beta_3$  in Invasion Activity of Highly Metastatic Syrian Hamster Fibroblasts. **EXCLI Journal**,3:105-114, 2004

MOSER, M. *et al.* The tail of integrins, talin, and kindlins. **Science**, v.324, n.5929, p.895-899, 2009.

NEBREDA, A. R. & WAGNER, E.F. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. **Nature Reviews**. 9: 537-549, 2009.

OHLER, M. *et al.* The venomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. **J. Proteome Res**. v.9, p. 2422-2437, 2010.

OLIVA, I. B. *et al.* Effect of RGD-disintegrins on melanoma cell growth and metastasis: involvement of the actin cytoskeleton, FAK and c-Fos. **Toxicol**, v.50, n.8, p.1053-1063, 2007.

PARISE, L. V.; LEE, J. W.; JULIANO, R. L. New aspects of integrins signaling in cancer. **Cancer Biol**. 10, 407-414, 2000.

- PAVELIC, S. K. *et al.* Metastasis: new perspectives on an old problem. **Molecular Cancer**. 10:22, 2011.
- PEEPER, D. S. & GEIGER, T. R. Metastasis mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta**. 293–308. 2009.
- PEINADO, H. *et al.* The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: Old sayings and new thoughts. **Semin Cancer Biol**. 1-8. 2011.
- PERRET, G. Y.; CRÉPIN, M. New pharmacological strategies against metastatic spread. **Fundam Clin Pharmacol**, v.22, n.5, p.465-492, 2008.
- PETRUZZELLI, L., TAKAMI, M., HUMES, H. D. Am . Structure and function of cell adhesion molecules. **J.Med.**, v. 106, n. 4, p. 467-476, 1999.
- PONTES, C.L.S. Produção Recombinante e caracterização de uma desintegrina da peçonha de *Rhinocerophis alternatus* (antiga *Bothrops alternatus*) com atividade anti-metastática visando o desenvolvimento de um novo fármaco. **Universidade Federal de São Carlos**. 2011.
- PONTIER, S.M. & MULLER, W.J. Integrins in breast cancer dormancy. **APMIS.**, v. 116, n. 7-8., p.677-684, 2008.
- PUDDU, P.E. GPIIb/IIIa Receptor Antagonism Using Small Molecules Provides no Additive Long-Term Protection after Percutaneous Coronary Intervention as Compared to Clopidogrel Plus Aspirin. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**.4: 151-156, 2010.
- RAMOS, O. H. *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, n.1, p.53-64, 2008.

- RIBEIRO, J.U. Efeitos das desintegrinas Alternagina-C e DisBa-01 de *Bothrops alternatus* em fibroblastos, células endoteliais e tumorais. **Universidade Federal de São Carlos**, 2009.
- ROCHA, M.M.T. & FURTADO, M. F. D. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus*, Duméril, Bibron & Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil (Serpentes, Viperidae). **Rev. Brás. Zool.**, v. 22, n. 2, p. 383-393, 2005.
- SÁNCHEZ, E. E. *et al.* Colombistatin: a disintegrin isolated from the venom of the South American snake (*Bothrops colombiensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion. **Arch Toxicol**, v.83, n.3, p.271-279, 2009.
- SANTULLI, G. *et al.* Evaluation of the anti-angiogenic properties of the new selective avb3 integrin antagonist RGDechiHCit. **Journal of Translational Medicine**, 9:7, 2007.
- SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. *et al.* Snake Venom Disintegrins and Cell Migration. **Toxins**, v.0, n.2, p.2606-2621, 2010.
- SHEU, J.R. *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**. 1336, 445–454, 1997.
- SHIMAOKA, M., SPRINGER, T.A. Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function. **Nat Rev Drug Discov**. 2(9):703-16, 2003.
- SHREY, K. *et al.* RNA interference: emerging diagnosis and therapeutics tool. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2009.
- SOUZA, A. J. *et al.* Gene silencing: concepts, applications and perspectives in woody plants. **Sci Agric (Piracicaba, Braz)**, 64 (6):654-656, 2007.

TAKADA, Y., YE, X., SIMON, S. The Integrins. **Genome Biology**. 8(5) 215.1-215.9, 2007.

TSURUO, T. & FUGITA, N. Platelet aggregation in the formation of tumor metastasis. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci**. v.84 (4) 189-198. 2008.

TUCCI, M. *et al.*  $\beta_3$  Integrin Subunit Mediates the Bone-Resorbing Function Exerted by Cultured Myeloma Plasma Cells. **Cancer Res.**,69:6738-6746. 2009.

ZHANG, Y. *et al.* Screening of a PKC zeta-specific kinase inhibitor PKCzI257.3 which inhibits EGF-induced breast cancer cell chemotaxis. **Invest New Drugs**. 2010.

ZHOU, Q. *et al.* Contortrostatin, a dimeric disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix*, inhibits breast cancer progression. **Breast Cancer Res Treat**, v.61, n.3, p.249-260, 2000.

[www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) – acesso 21/09/2012

[www.who.int](http://www.who.int) – acesso em 17/09/2012.