

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CAMPUS SÃO CARLOS

PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS PIPGCF UFSCar – UNESP

TAÍS MAROLATO DANILUCCI

**Inibição do *cross-talk* entre alfa (v) beta (3) e VEGFR2 na
angiogênese pela desintegrina DisBa-01**

SÃO CARLOS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CAMPUS SÃO CARLOS

PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS PIPGCF UFSCar – UNESP

TAÍS MAROLATO DANILUCCI

**Inibição do *cross-talk* entre alfa (v) beta (3) e VEGFR2
na angiogênese pela desintegrina DisBa-01**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação Ampla UFSCar/ UNESP, para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração Ciências Fisiológicas.

Orientação: Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

SÃO CARLOS

2018

Marolato Danilucci , Tais

Inibição do cross-talk entre alfa (v) beta (3) e VEGFR2 na angiogênese pela desintegrina DisBa-01 / Tais Marolato Danilucci . -- 2018.

92 f. : 30 cm.

Tese (doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador: Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

Banca examinadora: Márcia Regina Cominetti, Gerson Jonathan Rodrigues, Monica Rosas da Costa Iemma, Andrei Leitão

Bibliografia

1. DisBa-01. 2. alfavbeta3 VEGFR2. 3. cross-talk. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Taís Marolato Danilucci, realizada em 23/05/2018:

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Sélistre de Araujo
UFSCar

Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti
UFSCar

Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues
UFSCar

Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa Iemma
UNIARA

Prof. Dr. Andrei Leitão
IQSC/USP

*A única coisa que importa é colocar em prática, com
sinceridade e serenidade aquilo em que se acredita!*

Dalai Lama

Dedico esse trabalho aos meus queridos pais José Luiz e Adriana, com todo meu amor e gratidão, por tudo que fizeram e fazem por mim. Desejo poder ter sido merecedora do esforço dedicado por vocês.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Há 4 anos, foi-me dada uma grande oportunidade, cursar o Doutorado. Fazer parte do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular e da UFSCar foi muito especial e grandioso, aprendi muito e pude conhecer pessoas que se tornaram parte da minha vida. Por isso, minha eterna gratidão à Prof^a Dr^a Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo, minha orientadora, por ter-me aceitado em seu laboratório e por me oferecer conhecimento. Professora Heloisa, muito obrigada por tudo o que a senhora fez por mim, pela paciência e por ter-me dado a oportunidade de desenvolver esse trabalho.

Aos meus pais, que não mediram esforços para que eu pudesse estudar e realizar meu sonho. Obrigada pelos conselhos, pelos ensinamentos de vida e pela ajuda financeira. Agradeço por me educarem no caminho do bem e por me ensinarem a lutar, a ser forte e nunca desistir. Sem vocês não seria possível chegar até aqui. Obrigada Bruno, meu irmão, pelos momentos em família, os quais foram muito importantes durante esses anos.

Aos meus avós paternos Sérgio (*in memoriam*) e Julia pela educação e amor oferecidos a mim. Vocês me ensinaram que para vencer na vida é preciso lutar com humildade. Peço desculpas a minha avó Julia por estar ausente nos momentos em que ela mais precisou dos meus cuidados e por seus choros de saudades. Muito obrigada por tudo o que vocês fizeram por mim, minha gratidão será eterna.

Aos meus avós maternos, Idson e Dete, pelo amor e carinho que sempre tiveram por mim. Obrigada por cuidarem de mim, do Miguel e da Madhu. Sem a ajuda de vocês teria sido mais difícil. Jamais esquecerei a ajuda que me deram, principalmente por ficarem com a Madhu quando eu precisei me dedicar mais ao trabalho.

Miguel, meu futuro marido, meu companheiro, muito obrigada por entender os meus altos e baixos, os problemas, as aflições, o estresse e a minha loucura. Você com toda paciência, sempre esteve ao meu lado me apoiando e me ajudando a vencer.

Obrigada a todos da minha família que sempre torceram por mim e por entenderem minha ausência.

Aos docentes do Departamento de Ciências Fisiológicas, em especial:

Ao Prof. Dr. Gerson Jonathan Rodrigues por muitas vezes ter disponibilizado o Laboratório de Farmacologia e por todos os esclarecimentos.

Ao Prof. Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez, por ter disponibilizado o Laboratório de Fisiologia do Exercício.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, em especial, Bete (Irene), Sr. Ângelo, Tati, Carmem e Alaxandre, secretário da pós-graduação. Muito obrigada por sempre serem solícitos e por me tratarem muito bem, sempre com muito carinho e atenção.

À técnica do LBBM e amiga Graziéle, por todos os momentos que passamos juntas, por toda paciência e cooperação. Muito obrigada por tudo!

À Prof^a. Dr^a Marcia Regina Cominetti, por ter disponibilizado o Laboratório de Biologia do Envelhecimento e por sempre ser muito solícita.

Aos Professores Doutores Hernandes Faustino de Carvalho (Unicamp/Campinas) e Andrei Leitão (USP/São Carlos), pelos esclarecimentos e ensinamentos.

À técnica Roberta do Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (USP/Ribeirão Preto), por sempre nos atender com prontidão e eficiência.

À Prof^a. Dr^a Monica Rosas da Costa Lemma (UNIARA/Araquarara), por sempre me apoiar, me ajudar e torcer por mim.

A todos do LBBM: Cyntia, Kelli, Leonardo, Sabrina, Vinicius, Uliana, Bruna, Milene, Carol Bellani, Wanessa, Karolzinha, Antonio, Ana Carol, Anelyse e Julia. Muito obrigada por fazer parte dessa jornada, de alguma maneira vocês foram muito importantes. Agradeço em especial a Patty e ao Rafael, que se tornaram meus amigos desde o primeiro dia no LBBM. Obrigada pela amizade, pela cooperação e pelo carinho.

Às minhas alunas de iniciação científica, Bianca e Tayná. Muito obrigada por me aceitarem como co-orientadora e pela cooperação.

Aos integrantes do Laboratório de Farmacologia e do Laboratório de Biologia do Envelhecimento. Em especial a Carol Martin, por me ensinar e por abrir as portas da sua casa quando eu precisei. Muito obrigada!

Agradeço as Professoras Doutoras Russolina B. Zingali (UFRJ) e Christina Barja-Fidalgo (UERJ) que possibilitaram a Bolsa CAPES.

À CAPES e à Fapesp pelo auxílio financeiro concedido para realização deste trabalho.

À Deus por me sustentar na fé e por me permitir viver essa experiência maravilhosa, a qual me trouxe conhecimentos e amigos.

RESUMO

Angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, o qual ocorre tanto em condições fisiológicas quanto patológicas. O equilíbrio inadequado entre fatores pró- e anti-angiogênicos pode levar ao aparecimento de disfunções fisiopatológicas, notadamente no desenvolvimento de tumores e metástases. A integrina $\alpha_v\beta_3$ é considerada um dos receptores regulatórios da angiogênese devido ao seu *cross-talk* com o receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2). Compreender como esses componentes interagem funcionalmente como repressores é de extrema importância para a identificação de novas estratégias terapêuticas. As desintegrinas são pequenos peptídeos ricos em cisteína, derivadas do veneno de serpentes, com capacidade de ligarem-se especificamente às integrinas bloqueando suas funções. A DisBa-01, uma desintegrina recombinante RGD (Arginina - Glicina - Ácido aspártico) de *Bothrops alternatus*, possui alta afinidade por $\alpha_v\beta_3$ e exibe propriedades anti-metastáticas e anti-angiogênicas. Porém, sua interação no *cross-talk* entre a integrina $\alpha_v\beta_3$ e o VEGFR2 e sua ação sobre as vias de sinalização de tais receptores ainda não foram exploradas. Neste trabalho, apresentamos evidências *in vitro* da associação direta entre DisBa-01 e o complexo $\alpha_v\beta_3$ /VEGFR2 em células endoteliais umbilicais humanas. A DisBa-01 inibiu significativamente a viabilidade, a migração, a invasão, a adesão à vitronectina e tubulogênese, diminuindo assim a resposta angiogênica. O tratamento com DisBa-01 não afetou a expressão de β_3 , no entanto, regulou negativamente a expressão proteica de VEGFR2. A fosforilação mediada por VEGF, de ambos os receptores, foi inibida, promovendo a regulação negativa das vias de sinalização ERK1/2 e PI3K. Além disso, a modulação positiva das vias FAK/Src/Paxillin resultou na reorganização do citoesqueleto de actina e na inibição da migração e da adesão celular. Em conclusão, DisBa-01 compromete o *cross-talk* entre $\alpha_v\beta_3$ e VEGFR2 em HUVECs, o que interfere nas vias de sinalização de ERK1/2, PI3K, FAK, Src e Paxillin, resultando em ação anti-angiogênica e alterações morfológicas celulares. Estes resultados comprovam ainda que a integrina $\alpha_v\beta_3$ controla a resposta angiogênica ao VEGF.

ABSTRACT

Angiogenesis, a process by which new capillaries are formed from pre-existing vasculature, is essential in both physiological and pathological conditions. Inadequate balance between pro and antiangiogenic factors can contribute to the progression of tumors and development of metastases. The $\alpha_v\beta_3$ integrin is considered an angiogenic regulatory receptor due to its cross-talk with vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2). Understanding how these components functionally interact as angiogenic repressors is crucial for the identification of new therapeutic strategies. Disintegrins comprise a family of low molecular weight, cysteine-rich peptides from snake venoms that specifically bind to integrins, inhibiting their functions. DisBa-01, a recombinant RGD (Arginine - Glycine - Aspartic acid)-disintegrin from *Bothrops alternatus* venom, has high affinity for $\alpha_v\beta_3$, exhibiting anti-metastatic and anti-angiogenic properties. However, its role in the cross-talk between β_3 integrin and VEGFR2 in addition to its involvement in downstream signaling pathways, has not been explored. The present study has shown *in vitro* evidences regarding the direct association between DisBa-01 and the β_3 /VEGFR2 complex in human umbilical endothelial cells. DisBa-01 inhibited VEGF-induced viability, migration, invasion, adhesion to vitronectin and tubulogenesis, thus decreasing the angiogenic response. DisBa-01 treatment did not affect β_3 expression, however, it decreased VEGFR2 protein expression. VEGF-mediated phosphorylation of both receptors was inhibited, causing downregulation of ERK1/2 and PI3K signaling pathways. DisBa-01 positively regulated FAK/Src/Paxillin downstream signal, affecting actin cytoskeleton reorganization, cell migration and adhesion. In conclusion, DisBa-01 impairs the β_3 /VEGFR2 cross-talk in HUVECs, which interferes in the signaling pathways of ERK1/2, PI3K, FAK, Src and Paxillin, resulting in anti-angiogenic action and cellular morphological alterations. Moreover, these results indicate a strong regulatory role of $\alpha_v\beta_3$ integrin on VEGF-induced angiogenesis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Mecanismos de formação de vasos sanguíneos.....	19
FIGURA 2. O microambiente tumoral favorece a angiogênese.....	22
FIGURA 3. Família VEGF e seus receptores.....	25
FIGURA 4. Transdução de sinal do VEGFR2.....	27
FIGURA 5. Integrinas.....	29
FIGURA 6. Integrinas em seus estados inativo e ativo.....	30
FIGURA 7. $\alpha_v\beta_3$ promove vias distintas de angiogênese tumoral.....	32
FIGURA 8. $\alpha_v\beta_3$ /VEGFR2 <i>cross-talk</i>	33
FIGURA 9. Resistência a terapia anti-angiogênica.....	36
FIGURA 10. Classes de SVMPs.....	39
FIGURA 11. Sequência nucleotídica da DisBa-01.....	42
FIGURA 12. Bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ prejudica a sinalização do VEGF..	92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Fatores angiogênicos	20
--------------------------------------	----

MOTIVOS ADESIVOS DAS DESINTEGRINAS

ECD - Ácido glutâmico - Cisteína - Ácido aspártico

DCD - Ácido aspártico - Cisteína - Ácido aspártico

KTS - Lisina - Treonina - Serina

KGD - Lisina - Glicina - Ácido aspártico

MGD - Metionina - Glicina - Ácido aspártico

MLD - Metionina - Leucina - Ácido aspártico

MVD - Metionina - Valina - Ácido aspártico

RGD - Arginina - Glicina - Ácido aspártico

RTS - Arginina - Treonina - Serina

VGD - Valina - Glicina - Ácido aspártico

WGD - Triptofano - Glicina - Ácido aspártico

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADAM** – Desintegrina e metaloprotease
- AKT** - Proteína quinase B
- bFGF** - Fator básico de crescimento de fibroblastos
- BMDC** - Células derivadas da medula óssea
- CAM** - Membrana corio-alantóica de ovo de galinha
- CE** - Célula endotelial
- EPC** – Células progenitoras endoteliais da parede vascular
- ERK1/2** - Quinases reguladas por sinais extracelulares 1 e 2
- FAK** - Quinase de adesão focal
- FGF** - Fator de crescimento de fibroblastos
- FIGF** - Fator de crescimento induzido por c-FOS
- HIF-1 α** - Fator induzido por hipóxia 1 alfa
- HUVEC** - Célula endotelial de veia umbilical humana
- ICAM** - Moléculas de adesão celular
- Ig** - Imunoglobulinas
- MAPK** - Proteína quinase ativada por mitógeno
- MEC** - Matriz extracelular
- MMP** - Metaloproteinase de matriz
- MP** - Metaloprotease
- MTOR** - Alvo de rapamicina em mamíferos
- NCK** - Proteína adaptadora de tirosina quinase
- NRP1** – Neuropilina 1
- NRP2** – Neuropilina 2
- OSCC** - Células escamosas de carcinoma da cavidade oral
- PDGF** - Fator de crescimento derivado de plaquetas
- PI3K** - Fosfatidilinositol 3-quinase

PKC - Proteína quinase C

PLC- γ - Fosfolipase C- γ

PIGF - Fator de crescimento placentário

RAC - Substrato de toxina botulínica C3

RNA_m - RNA mensageiro

RTK - Receptor endotelial tirosina-quinase

SCK - Proteína adaptadora relacionada a Shc

SCs - Células da linhagem de monócitos/macrófagos

SVMP - Metaloproteases de veneno de serpente

TGF- α/β - Fator de crescimento transformador alfa/beta

TKI - Inibidores de tirosina quinase

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

VCAM-1 – Molécula de adesão celular vascular-1

VEGF/VPF - Fator de crescimento endotelial vascular/Fator de permeabilidade vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Visão Geral da Angiogênese.....	17
1.2 Angiogênese Tumoral.....	21
1.3 Família VEGF.....	23
1.4 Sinalização VEGF/VEGFR2.....	25
1.5 Matriz Extracelular e integrinas.....	27
1.6 Funções da integrina $\alpha_v\beta_3$ na angiogênese.....	31
1.7 <i>Cross-talk</i> entre $\alpha_v\beta_3$ e VEGFR2.....	32
1.8 Terapia anti-angiogênica tumoral.....	34
1.8.1 Agentes anti-VEGF.....	34
1.8.2 Inibidores de integrinas.....	36
1.9 Desintegrinas.....	38
1.10 Desintegrinas RGD anti-angiogênicas.....	40
1.10 DisBa-01.....	41
2.JUSTIFICATIVA.....	44
3. HIPÓTESE.....	46
4.OBJETIVOS.....	46
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
6. MANUSCRITO – EM FASE DE REDAÇÃO.....	54
7. CONCLUSÃO.....	91

1. INTRODUÇÃO

1.1 Visão Geral da Angiogênese

A angiogênese é o processo pelo qual novos vasos se formam a partir de vasos sanguíneos pré-existentes em uma área vascular. O termo foi elaborado há dois séculos pelo cirurgião escocês Dr. John Hunter, o qual descreveu a importância da formação de novos vasos para a expansão de tecidos (HUNTER, 2015). Em 1907, o professor Goldmann, visualizou uma extensa formação de vasos sanguíneos durante a progressão tumoral (GOLDMANN, 1907). Dentre meados dos anos 30 a 70, alguns autores hipotetizaram que a liberação de fatores específicos tumorais e a malignidade seriam capazes de estimular o crescimento de vasos e concluíram que o crescimento tumoral poderia estar intimamente correlacionado com o desenvolvimento de uma rede intrínseca vascular (ALGIRE GH, CHALKLEY HW, 1945; GREENBLATT; PHILIPPE, 1968; IDE AG, WARREN SL., 1939; YANG et al., 2017). Em 1971, Folkman e colaboradores forneceram as primeiras evidências da dependência do crescimento tumoral na neovascularização, além de postularem que a inibição da angiogênese poderia ser terapêutica (FOLKMAN, 1971; RIBATTI, 2008). Desde então, informações intrigantes foram obtidas sobre os mecanismos moleculares da modulação da angiogênese em processos fisiológicos e patológicos.

Os vasos sanguíneos surgiram evolutivamente para fornecerem nutrientes, oxigênio e outras moléculas, bem como sangue e células imunes a todos os tecidos do organismo. A formação dos vasos sanguíneos ocorre por dois mecanismos diferentes, a vasculogênese e a angiogênese. Na sua forma de realização mais simples, o processo de desenvolvimento vascular envolve os seguintes passos: formação; estabilização; ramificação, remodelação e poda; e especialização dos vasos (JAIN, 2003).

Durante o desenvolvimento embrionário, os componentes vasculares são formados por meio da vasculogênese, em que há a formação de um plexo vascular primário de origem mesodérmica por progenitores endoteliais, chamados angioblastos (RISAU, 1997). Os angioblastos se diferenciam em células endoteliais (CEs) que se agregam para formar vasos primitivos como tubos endoteliais sem cobertura celular que, subsequentemente, formam uma rede de capilares maduros por brotamento

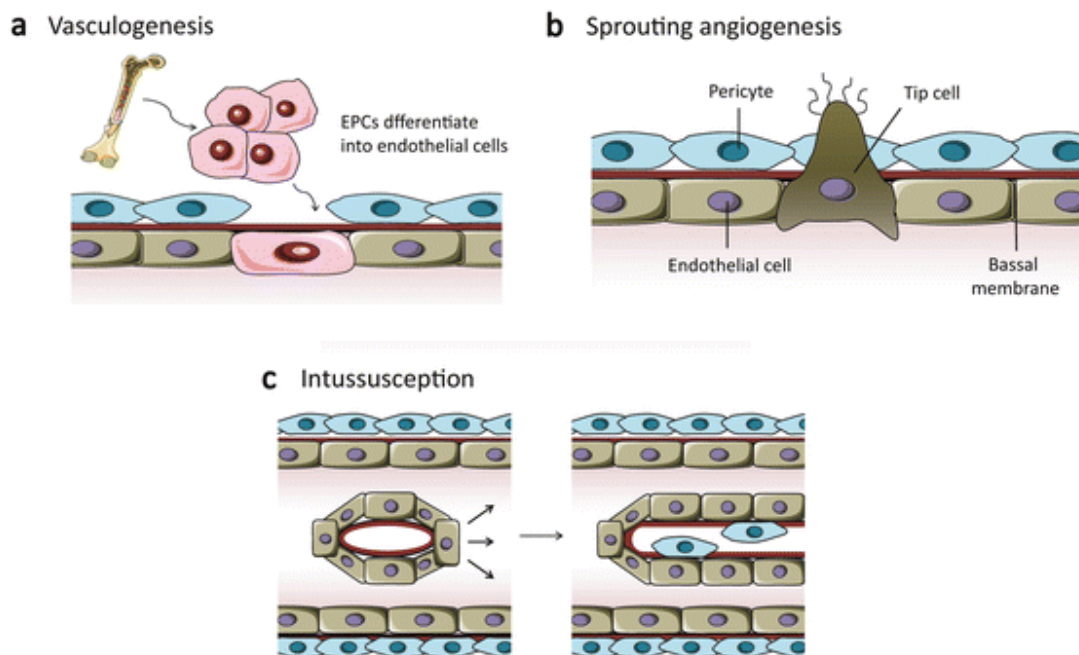
(angiogênese germinativa) ou intussuscepção (angiogênese não-germinativa) (POTENTE; GERHARDT; CARMELIET, 2011; RISAU, 1997).

A angiogênese germinativa inicia-se com a dissolução da membrana basal e o consequente descolamento do capilar de células associadas com as paredes dos vasos sanguíneos, denominadas pericitos. Em seguida, as CEs migram para o espaço extracelular dando origem a um broto endotelial e proliferam formando um lúmen que se entrelaça a outro vaso. Em uma etapa final, os pericitos são recrutados para o novo vaso e a membrana basal é formada (FIGURA 1a) (CARMELIET; JAIN, 2011).

A intussuscepção, processo em que um único capilar se divide longitudinalmente em dois pela formação de um septo, é responsável pela remodelação vascular. As células endoteliais de lados opostos do vaso se estendem intraluminalmente até entrarem em contato formando um septo, levando ao surgimento de dois vasos (FIGURA 1c). Este processo ocorre quando o sistema capilar se expande “dentro dele mesmo” como, por exemplo, no crescimento intersticial no tecido cartilaginoso (CARMELIET; JAIN, 2011; ZECCHIN et al., 2017).

Existe outro mecanismo de formação de vasos sanguíneos, o qual está relacionado tanto com o reparo de vasos adultos quanto à expansão de vasos patológicos, sendo auxiliado pelo recrutamento de células derivadas da medula óssea (BMDCs) e/ou células progenitoras endoteliais da parede vascular (EPCs), as quais são incorporadas no revestimento endotelial e se diferenciam em CEs (FIGURA 1b) (ZECCHIN et al., 2017).

FIGURA 1 - Mecanismos de formação de vasos sanguíneos



Fonte: CARMELIET; JAIN, 2011

A formação de vasos pode ocorrer através da angiogênese germinativa **(a)**; pela vasculogênese, processo no qual ocorre o recrutamento de células progenitoras endoteliais (EPCs) derivadas da medula óssea e/ou residentes na parede vascular, as quais se diferenciam em células endoteliais (CEs) **(b)**; ou por divisão de brotamentos, processo conhecido como intussuscepção **(c)**.

Após a formação dos vasos, há o processo de maturação e especialização, o qual é determinado pelo crescimento, ramificação e poda de seus diferentes segmentos por fatores intra e extra luminiais angiogênicos e componentes da membrana basal e da matriz extracelular (MEC) (JAIN, 2003; POTENTE; GERHARDT; CARMELIET, 2011; RISAU, 1997).

O processo angiogênico é regulado por fatores estimuladores e inibidores (TABELA 1). Os fatores pró-angiogênicos participam do controle da formação de um novo capilar, e incluem os fatores de crescimento, as moléculas de adesão celular, os sinais de diferenciação, os quimiotáticos e as enzimas proteolíticas (CARMELIET, 2003; CARMELIET; JAIN, 2011; KLAGSBRUN, 1991). Os inibidores fornecem equilíbrio para manter as células endoteliais inativas, porém altamente responsivas para sinais anulatórios, que quando ativados, podem levar a uma resposta angiogênica deletéria. Os inibidores agem atenuando ou bloqueando a proliferação, a

transdução de sinais, a migração e a sobrevivência celular (CARMELIET; JAIN, 2011; KLAGSBRUN, 1991).

TABELA 1 - Fatores angiogênicos

Nome	Angiogênese	EC - migração	EC - proliferação
FGF*	+	+	+
VEGF/VPF*	+	+	+
PDGF*	+	+	+
TGF- α *	+	+	+
Angiogenina	+	0	0
Angiotroponina	+	+	0
TGF- β *	+	-	-
TNF- α *	+		-
Interferon- γ	-	-	-
Protamina	-	Nd	-

Fonte: KLAGSBRUN, 1991; POTENTE; GERHARDT; CARMELIET, 2011

Abreviações: + = ativador; 0 = não; - inibidor; nd = não determinado; CE = célula endotelial; *FGF= Fator de crescimento de fibroblastos; *VEGF/VPF = Fator de crescimento endotelial vascular/Fator de permeabilidade vascular; *PDGF = Fator de crescimento derivado de plaquetas; *TGF- α/β = Fator de crescimento transformador alfa/beta; *TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa.

Em humanos adultos, os vasos saudáveis estabelecidos são revestidos por uma única monocamada de CEs quiescentes e estímulos como isquemia (privação de nutrientes), hipóxia (privação de oxigênio) e/ou lesão tecidual (inflamação) são capazes de mudar rapidamente o perfil dessas células para um estado proliferativo/angiogênico (FOLKMAN, 2007a; JAIN, 2003). A angiogênese e a maturação dos vasos contribuem para diversos processos fisiológicos, incluindo cicatrização de feridas, ciclo reprodutivo, formação da placenta e maturação ocular (FOLKMAN, 2007a).

Em situações patológicas, o crescimento dos vasos é desregulado e contribui para diversas desordens, tais como crescimento tumoral, metástases e doenças inflamatórias, como retinopatia diabética, artrite reumatoide, aterosclerose, endometriose, doença de Crohn, psoríase, dentre outras (CARMELIET, 2003; FOLKMAN, 1995a, 2007b). Em contrapartida, o crescimento insuficiente e a regressão anormal de vasos podem causar isquemia cardíaca e cerebral, neurodegeneração, hipertensão, pré-eclâmpsia e osteoporose (CARMELIET, 2003; FOLKMAN, 1995a, 2007b).

1.2 Angiogênese tumoral

O câncer tem a capacidade de se espalhar para órgãos adjacentes ou distantes, o que torna a sua presença um alto risco para a vida. As células tumorais podem penetrar vasos sanguíneos ou linfáticos, circular através do fluxo intravascular e proliferar em outro local por um processo denominado metástase (FOLKMAN, 2003). O fenótipo angiogênico dos tumores é regulado pelo microambiente tumoral, o qual é composto por uma variedade de tipos celulares e moléculas que influenciam a resposta angiogênica (DE PALMA; BIZIATO; PETROVA, 2017; WEIS; CHERESH, 2011a).

Uma vez que uma lesão tumoral exceda alguns milímetros de diâmetro, a hipóxia e a isquemia desencadeiam a produção de fatores pró-angiogênicos para permitir que o tumor progrida. As células tumorais exploram seu microambiente liberando citocinas e fatores de crescimento e ativam CEs quiescentes, as quais iniciam uma cascata de eventos que, rapidamente, se torna desregulada (FOLKMAN, 2002; SIA et al., 2014).

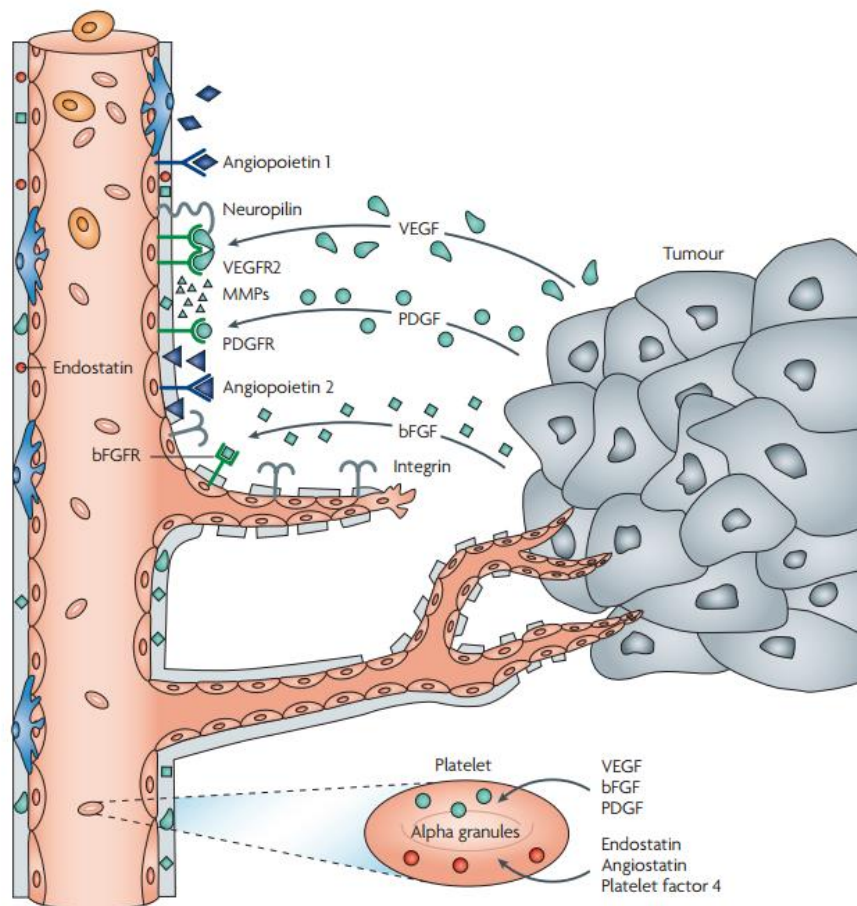
Embora a indução da angiogênese possa inicialmente fornecer ao tumor mais oxigênio e nutrientes, a resposta final é ruim, pois os vasos sanguíneos dos tumores são desorganizados, disfuncionais e com desenvolvimento anormal. A vasculatura tumoral não possui a hierarquia organizada de um leito vascular normal, e compreende uma rede caótica de vasos estrutural e funcionalmente defeituosos. Além disso, os vasos tumorais são vazados, tortuosos e possuem um lúmen irregular. Portanto, o fluxo sanguíneo é arbitrário e lento com má perfusão, o que, juntamente com uma barreira endotelial com vazamento, promove o escape metastático das células cancerígenas (ROHLENOVA et al., 2017; WEIS; CHERESH, 2005).

Durante a angiogênese tumoral, os fatores de crescimento estimulam o surgimento e a proliferação de CEs, enquanto os locais de lâmina basal, expostos durante o vazamento vascular, recrutam e ativam plaquetas que liberam fatores angiogênicos e de permeabilidade para aumentar a resposta local. Quantidades aumentadas do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) recrutam e ativam células perivasculares, as quais não fornecem vasos maduros e estáveis devido aos

sinais estimulatórios persistentes do microambiente tumoral (FIGURA 2) (HELDIN; HELLBERG; ÖSTMAN, 2010; WEIS; CHERESH, 2005).

A resposta de remodelação do vaso é impulsionada pelo recrutamento de fibroblastos associados a tumores, que depositam de forma anormal proteínas da MEC e liberam fatores estimuladores. As metaloproteinases de matriz (MMPs) clivam e remodelam a MEC para formar fragmentos ou expor epítomos previamente ocultos e as células inflamatórias se movem para essa “ferida”, liberando fatores que modulam negativamente a resposta angiogênica (FIGURA 2) (ELICEIRI; CHERESH, 1999; WEIS; CHERESH, 2011).

Figura 2. O microambiente tumoral favorece o crescimento dos vasos sanguíneos.



Fonte: FOLKMAN, 2007c

Eventos ambientais ou genéticos transformam células epiteliais normais em células tumorais. A hipóxia e a privação de nutrientes desencadeiam a angiogênese. As células tumorais liberam fatores de crescimento solúveis, quimiocinas e citocinas, que criam um gradiente de concentração acarretando na proliferação de células endoteliais anteriormente quiescentes e no surgimento de vasos sanguíneos

vizinhos. Esses sinais também recrutam fibroblastos, os quais depositam um repertório de proteínas e enzimas da MEC na tentativa de remodelar e reparar o local. Este microambiente continuamente evolui à medida que o tumor se desenvolve, criando focos localizados de hipóxia, inflamação e renovação da MEC, afetando assim o crescimento, a remodelação e a maturação dos vasos sanguíneos.

1.3 Família VEGF

Desde a descoberta de que o desenvolvimento do câncer requer o crescimento de novos vasos sanguíneos, muitas moléculas foram relacionadas a este evento como reguladores da angiogênese, sendo o VEGF a mais importante dentre elas (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003a). O VEGF é um poderoso agente angiogênico em tecidos neoplásicos, bem como em tecidos normais. Sob a influência de certas citocinas e outros fatores de crescimento, membros da família VEGF aparecem no tecido tumoral e no estroma adjacente e desempenham função importante na neovascularização (FOLKMAN, 1995a, 1995b, 2003). A expressão de VEGF e de seu receptor é induzida por hipóxia através do fator induzido por hipóxia 1 alfa (HIF-1 α). Ao obterem nutrientes dos novos vasos sanguíneos, as células tumorais produzem mais VEGF, secretando-o no tecido circundante (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003b)

Nos mamíferos, existem cinco tipos de VEGF: VEGF (ou VEGFA), VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE e fator de crescimento placentário (PIGF). Dentre eles, VEGFA, VEGFB, VEGFC e VEGFE promovem a neovascularização, enquanto VEGFC e VEGFD estão envolvidos na linfangiogênese (FERRARA et al., 1992; NISHIDA et al., 2006). Os VEGFs se ligam com especificidade a três receptores endoteliais tirosina-quinases (RTKs), conhecidos como VEGFR1, 2 e 3, bem como a co-receptores, incluindo neuropilinas 1 e 2 (NRP1 e NRP2) e proteoglicanos de heparan sulfato (FIGURA 3). Além disso, algumas formas de VEGFs podem se ligar a componentes da MEC e a algumas integrinas (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003a; ROSKOSKI, 2008).

O VEGFA também conhecido como VEGF/Fator de permeabilidade vascular (VPF) é uma glicoproteína ligante de heparina que ocorre em pelo menos seis isoformas moleculares, as quais consistem de 121, 145, 165, 183, 189 e 206 aminoácidos (FERRARA et al., 1992; GERBER et al., 1998). O VEGF é um mitógeno potente e muito específico para CEs. Ele se liga a dois RTKs, VEGFR1 e VEGFR2, e em NRP1 e NRP2, estimulando a cascata completa de eventos intracelulares

necessários para a angiogênese, sendo superexpresso em uma variedade de tumores (DVORAK, 2002; FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003a). O VEGF é produzido como uma proteína pró-angiogênica ou anti-angiogênica, dependendo da escolha do local de splicing no oitavo exon. A seleção do local de splicing proximal no exon 8 origina isoformas pró-angiogênicas, tais como o VEGF₁₆₅, e a seleção do local de splicing distal resulta em isoformas anti-angiogênicas, tais como VEGF_{165b} (NOWAK et al., 2010). Por ser secretado pela maioria das células e tecidos animais e por desencadear respostas biológicas importantes e distintas nas células endoteliais, o VEGFA é notavelmente o mais estudado dentre as múltiplas isoformas do VEGF (FIGURA 3) (SMITH et al., 2015).

O VEGFB existe em duas isoformas proteicas, VEGF-B₁₆₇ e VEGF-B₁₈₆, e liga-se especificamente ao VEGFR1. Ele pode formar um heterodímero com o VEGFA, alterando a interação com seus receptores biológicos e modificando seus efeitos fisiológicos normais. Embora o VEGFB seja amplamente expresso no coração, músculo esquelético e células vasculares, sua função biológica permanece incerta. Os níveis de VEGFB aumentam tanto durante o desenvolvimento embrionário quanto após o nascimento, correlacionando-se estreitamente com a progressão da angiogênese cardíaca (FIGURA 3) (OLSSON et al., 2006; SMITH et al., 2015).

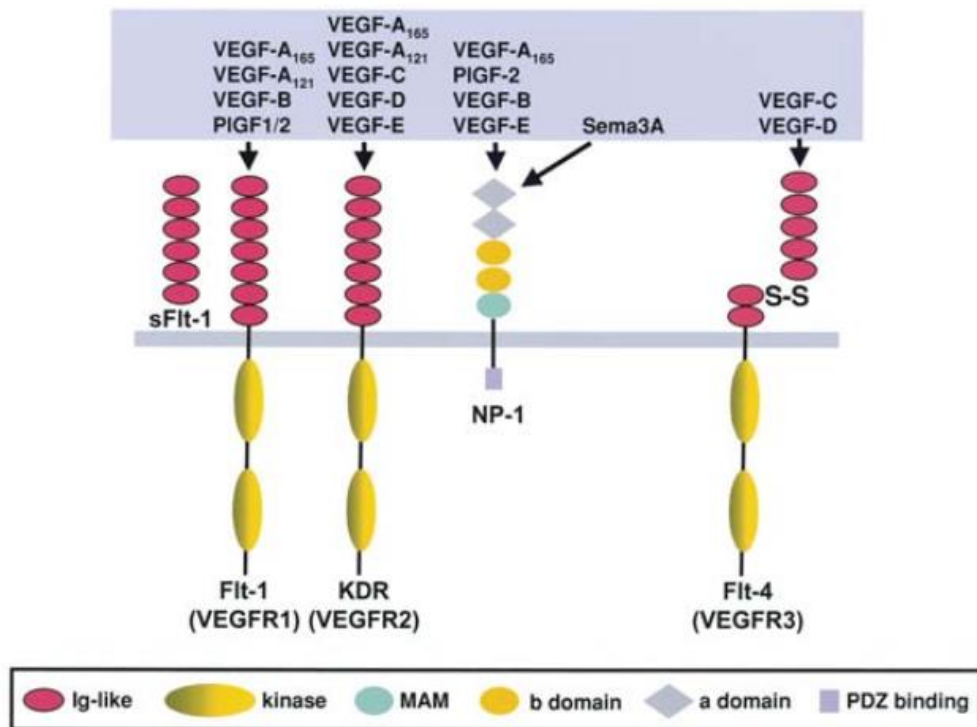
O VEGFC tem uma forma madura que possui um domínio de homologia ao VEGFA, sendo 30% idêntico à sequência de aminoácidos do VEGF₁₆₅. Sua expressão parece estar restrita ao desenvolvimento inicial e a certas configurações patológicas, como a angiogênese tumoral e a linfangiogênese (FIGURA 3) (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003a; TOI; MATSUMOTO; BANDO, 2001).

O VEGFD é conhecido como o fator de crescimento induzido por c-FOS (FIGF), e sua forma madura possui 61% de identidade com a sequência de aminoácidos do VEGFC, o que permite que ambos se liguem aos mesmos receptores (VEGFR2 e 3) nas células endoteliais humanas. Ao interagirem e ativarem o VEGFR3, VEGFC e VEGFD regulam a linfangiogênese, bem como a angiogênese nos estágios intermediários da embriogênese (FIGURA 3) (NISHIDA et al., 2006).

Com relação ao VEGFE (ou fator codificado por vírus orf), sua interação com seu receptor promove a proliferação de células endoteliais. Existe uma sobreposição

significativa entre o sítio de ligação de VEGFA e VEGFE no VEGFR2, sugerindo uma aliança das duas moléculas na resposta final da angiogênese ou, alternativamente, uma relação antagônica entre esses dois fatores (FIGURA 3) (HOEBEN et al., 2004a; NISHIDA et al., 2006).

FIGURA 3 - Família VEGF e seus receptores



Fonte: ZACHARY, 2003

A família VEGF compreende os fatores de crescimento placentário 1 e 2, e os VEGFs A, B, C, D e E. Os VEGFs C e D são ligantes para o VEGFR3, o qual é predominantemente superexpresso no endotélio linfático; enquanto que o VEGFA, é tido como o principal responsável por desencadear as respostas angiogênicas. Flt1 (VEGFR1) e KDR (VEGFR2), RTKs que reconhecem especificamente o VEGFA, possuem um domínio extracelular contendo sete *loops* semelhantes à *Ig-like* (ovais vermelhos), um único domínio hidrofóbico que permeia a membrana e um domínio citoplasmático (ovais amarelos). VEGFs C, D e E também se ligam ao VEGFR2, enquanto PIGF e VEGFB ligam-se apenas ao VEGFR1. Flt4 (VEGFR3) é um receptor específico para os VEGFs C e D.

1.4 Sinalização VEGF/VEGFR

Três receptores de tirosina quinase para VEGF foram identificados: a tirosina quinase *fms-like* Flt-1 (VEGFR1/Flt-1); a região do domínio quinase, também

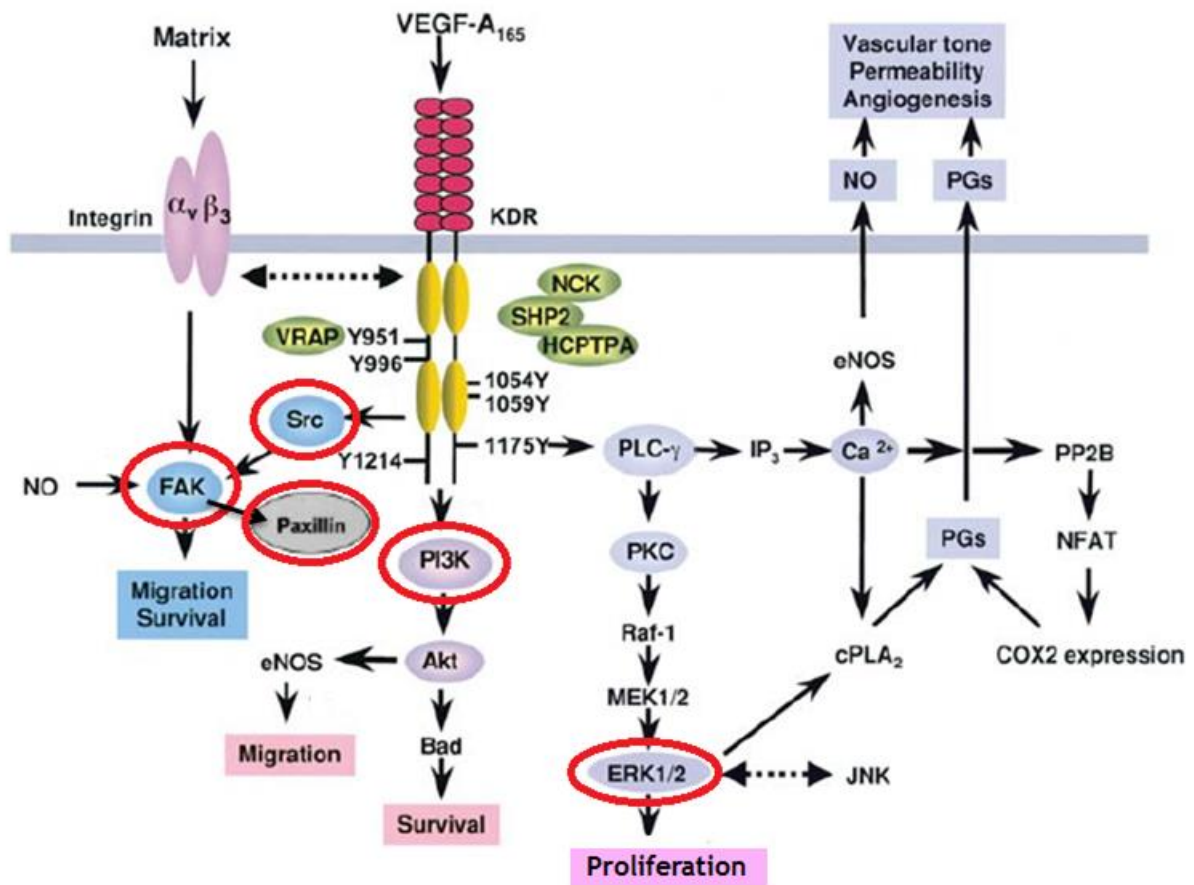
conhecida como quinase hepática fetal (VEGFR2/KDR/Flk-1) e Flt-4 (VEGFR3) (CLAESSON-WELSH, 2016). Cada receptor possui um domínio extracelular com aproximadamente 750 aminoácidos, que é organizado em 7 *loops* semelhantes a imunoglobulinas (*Ig-like*), um único segmento transmembrana, um domínio proteína-tirosina-quinase intracelular que contém uma inserção de cerca de 70 resíduos de aminoácidos e uma cauda carboxiterminal (FIGURA 3) (ROSKOSKI, 2008).

A sinalização VEGFA/VEGFR2 é específica para respostas celulares envolvidas na angiogênese (ROSKOSKI, 2008). A ligação do VEGF ao VEGFR2 resulta na auto-fosforilação de resíduos de tirosina no domínio citoplasmático do receptor, entre eles, o pTyr801, que regula a fosforilação de Tyr1054 e Tyr1059, aumentando a atividade de quinase do receptor (SIMONS; GORDON; CLAESSON-WELSH, 2016).

A auto-fosforilação do VEGFR2 leva ao recrutamento de moléculas tais como, fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-quinase ou PI3K), proteína quinase B (AKT), quinases reguladas por sinais extracelulares 1 e 2 (ERK 1/2), proteína adaptadora de tirosina quinase (NCK), proteína adaptadora relacionada a Shc (SCK), fosfolipase C- γ (PLC- γ), proteína quinase C (PKC), proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38MAPK), quinase de adesão (FAK), Ras-relacionada ao substrato C3 da toxina botulínica 1 (RAC), GTPases RHO e proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), as quais interagem entre si e induzem o *downstream* da sinalização angiogênica (FIGURA 4) (HOEBEN et al., 2004).

A estimulação de fatores de crescimento muitas vezes depende da adesão mediada por integrinas a proteínas da MEC. Essa rede de sinalização compreende módulos sincronizados que regulam a proliferação, migração, sobrevivência, anti-apoptose e permeabilidade vascular das CEs (HOEBEN et al., 2004; SIMONS; GORDON; CLAESSON-WELSH, 2016).

FIGURA 4 - Transdução de sinal do VEGFR



Fonte: ZACHARY, 2003

A ligação do VEGF ao VEGFR2 causa dimerização e autofosforilação do receptor. As vias de transdução de sinais são ativadas, levando ao aumento da proliferação, sobrevivência, permeabilidade e migração das CEs.

1.5 Matriz extracelular e integrinas

A MEC é uma estrutura que se situa entre as células e fornece o suporte para a arquitetura celular e para a organização do tecido, sendo constituída por diversos componentes moleculares, tais como: glicoproteínas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e colágeno (HYNES; NABA, 2012).

Ela fornece um suporte essencial para manter a organização das CEs nos vasos sanguíneos, principalmente pela ligação com integrinas presentes na superfície celular. Os mecanismos específicos pelos quais a MEC suporta as funções das CEs são complexos e envolvem a sustentação estrutural externa e a regulação de múltiplas

vias de sinalização intracelular, as quais controlam a apoptose, a proliferação, o citoesqueleto e a morfologia celular (DAVIS; SENGER, 2005).

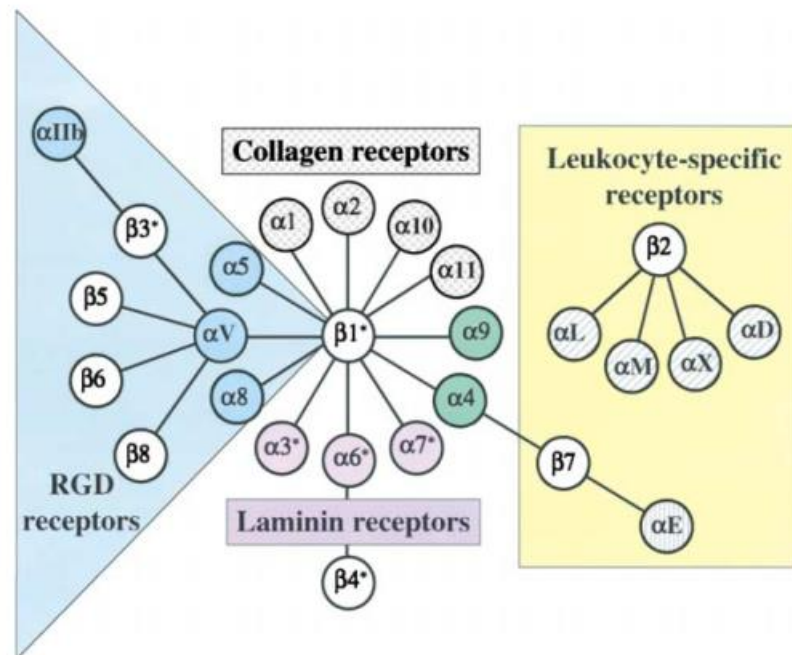
A composição, a topografia e a densidade de ligantes da MEC vascular e intersticial se tornam alteradas em tumores que são, frequentemente, rodeados por uma matriz com elevadas concentrações de colágeno e constituída por uma variedade de componentes que regulam a cascata angiogênica (DE PALMA; BIZIATO; PETROVA, 2017; WEIS; CHERESH, 2011a). A angiogênese tumoral é altamente dependente da ruptura da MEC, da capacidade migratória das CEs e de sua adesão às integrinas (DE PALMA; BIZIATO; PETROVA, 2017).

As integrinas são receptores heterodiméricos de membrana compostos por uma subunidade α e uma subunidade β (HYNES, 2002a). As subunidades formam, no total, 24 heterodímeros funcionais, combinados a partir de 18 subunidades α e 8 subunidades β (FIGURA 5) (HYNES, 2002b). As interações de adesão celular por meio das integrinas possuem papéis fundamentais na regulação de múltiplos aspectos da fisiologia celular, incluindo proliferação, viabilidade, diferenciação e migração (HYNES, 1987, 2002b).

Cada heterodímero consiste em um grande domínio extracelular, um domínio transmembrana e uma região citoplasmática intracelular geralmente curta (HYNES, 2002a). Os domínios extracelulares se ligam a uma grande variedade de ligantes da MEC, tais como colágeno, fibronectina, vitronectina, laminina e receptores celulares, como a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) e a família de moléculas de adesão celular (ICAM). Seus domínios citoplasmáticos intracelulares se ancoram às proteínas do citoesqueleto (HYNES, 2002b).

As integrinas podem ser divididas em quatro grupos diferentes: (1) receptores específicos de leucócitos, (2) de colágeno, (3) de laminina e (4) de Arginina-Glicina-Aspartato (RGD) (FIGURA 5) (HYNES, 1987, 2002a, 2002b). Por meio destes receptores de membrana, o exterior e o interior celular estão fisicamente ligados, o que permite a transmissão bidirecional de sinais mecânicos e bioquímicos através da membrana plasmática, levando a uma regulação cooperativa das funções celulares (GUERRERO; MCCARTY, 2017; HYNES, 2002b)

FIGURA 5 - Integrinas



Fonte: HYNES, 2002a

A figura retrata a associação entre as 8 subunidades β e as 18 subunidades α das integrinas, as quais formam 24 heterodímeros funcionais que podem ser divididos, de acordo com seus respectivos ligantes, em quatro grupos: receptores específicos de leucócitos, de colágeno, de laminina e de RGD.

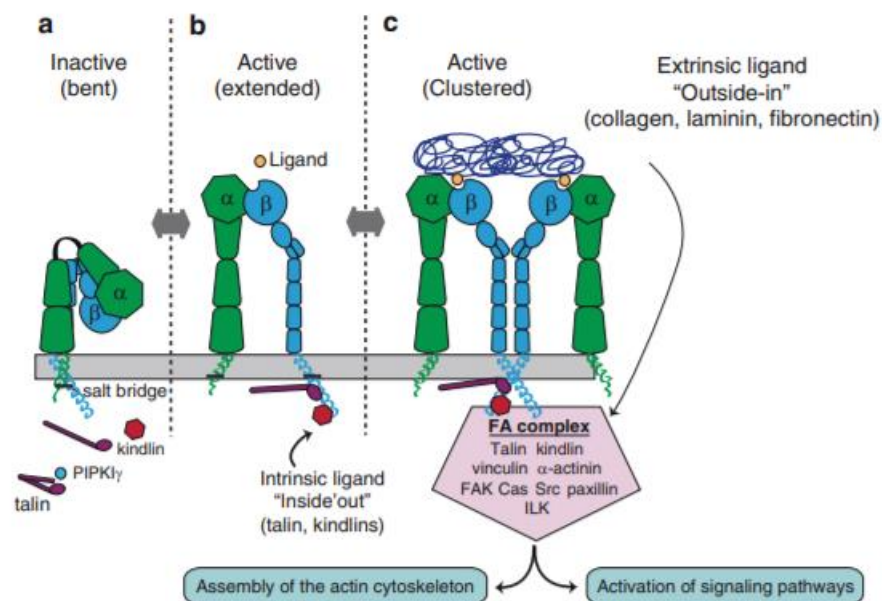
A maioria das integrinas é encontrada na superfície celular em um estado inativo ou “OFF”, estando normalmente ligadas a moléculas de baixa afinidade, as quais não desencadeiam sinalização. Durante esse estado, elas permanecem dobradas e suas subunidades associadas na região citoplasmática. As integrinas são ativadas por meio de sinalizações “inside-out” (de dentro para fora) e/ou “outside-in” (de fora para dentro) (FIGURA 6) (ROCHA et al., 2017).

A sinalização “inside-out” baseia-se na ação de uma proteína talina que se liga diretamente à cauda citoplasmática da subunidade β , interrompendo a sua ligação com a subunidade α , provocando uma alteração conformacional no domínio citoplasmático da integrina que se propaga para o domínio extracelular, aumentando o estado de afinidade ao ligante (FIGURA 6) (ATA; ANTONESCU, 2017; SHEN; DELANEY; DU, 2012). Este tipo de sinalização está diretamente envolvido na adesão e permite a transmissão das forças necessárias à migração celular e ao remodelamento da MEC (ROCHA et al., 2017).

A sinalização “*outside-in*” é observada sob ativação de receptores transmembrana (por exemplo, interações com o VEGFR2) e principalmente com componentes da MEC; e resulta em alterações nas caudas citoplasmáticas, possibilitando a ativação da integrina (FIGURA 6) (GUERRERO; MCCARTY, 2018; SRICHAJ; ZENT, 2010).

Uma vez que a ligação a uma proteína específica da matriz ocorre, há ativação e clusterização das integrinas, as quais ativam as vias de sinalização FAK, quinases da família Src, GTPases da família Rho, ERK1/2 e MAPK, resultando em alterações no comportamento celular (FIGURA 6) (MIRANTI; BRUGGE, 2002). Esses mecanismos de sinalização podem determinar se uma célula está em um microambiente apropriado e, conseqüentemente, podem afetar a sobrevivência, migração e invasão celular (HYNES, 2002b; MIRANTI; BRUGGE, 2002).

FIGURA 6 – Integrinas em seus estados inativo e ativo



Fonte: SRICHAJ; ZENT, 2010

Integrinas em seu estado de repouso inativo e não ligado **(a)**. Neste estado, as integrinas estão em uma conformação curva e as regiões transmembrana e citoplasmática estão intimamente associadas. Uma vez ativada por talinas, ocorre a separação das subunidades citoplasmáticas e transmembrana e há extensão dos domínios extracelulares das integrinas **(b)**. Quando as integrinas ativadas interagem com o ligante, elas se agrupam na membrana plasmática. O agrupamento é necessário para enviar sinais intracelulares para formação de aderências focais estreitas (FA), importantes para a montagem do citoesqueleto de actina e para a ativação de outros sinais que controlam diversas funções celulares **(c)**

1.6 Funções da integrina $\alpha_v\beta_3$ na angiogênese

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram um grande número de integrinas envolvidas na regulação da angiogênese, tais como $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ (AVRAAMIDES et al., 2008).

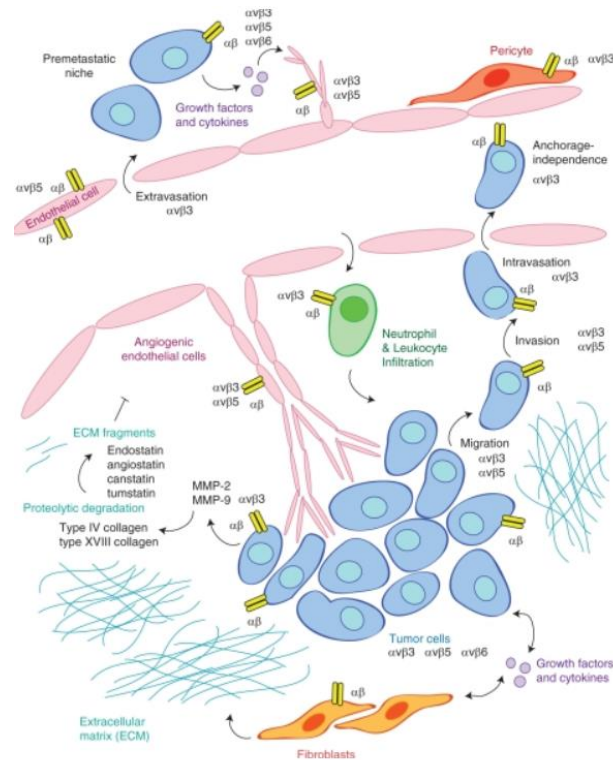
A integrina $\alpha_v\beta_3$ possui um sítio de reconhecimento de sequências de tripeptídeos RGD, que facilita sua interação com uma grande variedade de moléculas da MEC, incluindo vitronectina, fibronectina, fibrinogênio, fator von Willebrand, e formas hidrolizadas de colágeno e laminina (HYNES, 1987, 2002b). Muitas integrinas são ubiquamente expressas em tecidos adultos; no entanto, a integrina $\alpha_v\beta_3$ é abundantemente expressa em células endoteliais angiogênicas em remodelamento e em tecidos patológicos (BROOKS et al., 1994; BROOKS; CLARK; CHERESH, 1994).

O desenvolvimento de anticorpos bloqueadores e antagonistas da função das integrinas revelou que esses agentes apresentam efeitos preferenciais em certos modelos patológicos e que vias angiogênicas tumorais requerem a presença de $\alpha_v\beta_3$ (TUCKER, 2006; WEIS; CHERESH, 2011b).

A $\alpha_v\beta_3$ promove vias distintas de angiogênese tumoral, dentre elas a induzida pelo fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), pelo TNF- α e/ou pelo VEGF (WEIS; CHERESH, 2011a). A β_3 conduz à ativação das vias Ras/Raf/MEK/Erk, FAK, Src e p21 (PAK) nos vasos sanguíneos e desencadeia a adesão, proliferação, invasão e remodelamento das CEs (FIGURA 7) (TUCKER, 2006; WEIS; CHERESH, 2011b). Além disso, a $\alpha_v\beta_3$ participa do recrutamento de células inflamatórias para os locais de angiogênese e remodelação, e auxilia no estabelecimento do nicho pré-metastático (FIGURA 7) (AVRAAMIDES et al., 2008; WEIS; CHERESH, 2011).

Como as vias de sinalização das integrinas podem influenciar o comportamento de múltiplos tipos celulares envolvidos na angiogênese e no câncer, o direcionamento seletivo da adesão e sinalização mediada pela $\alpha_v\beta_3$ representa uma estratégia terapêutica promissora e atrativa (WEIS; CHERESH, 2011).

FIGURA 7 - $\alpha_v\beta_3$ promove vias distintas de angiogênese tumoral



Fonte: WEIS; CHERESH, 2011

A angiogênese tumoral é dependente da ação da integrina $\alpha_v\beta_3$ devido aos seus efeitos sobre a adesão, proliferação, invasão e remodelamento de ECs.

1.7 Cross-talk entre $\alpha_v\beta_3$ e VEGFR2

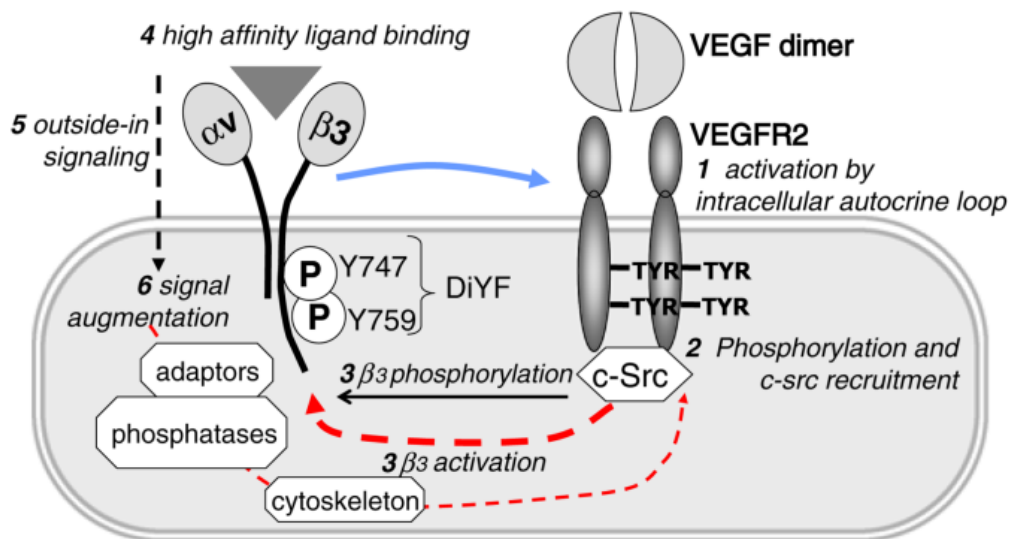
O *cross-talk* entre os receptores de VEGF e as integrinas é crucial para várias funções celulares. Nas células endoteliais, a interação entre $\alpha_v\beta_3$ e VEGFR2 é particularmente importante durante a vascularização (SOMANATH; CIOCEA; BYZOVA, 2009; SOMANATH; MALININ; BYZOVA, 2009). Evidências sugerem que as integrinas $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ se ligam diretamente a vários fatores de crescimento e interagem com diversas isoformas de VEGF. Além disso, vários receptores de fatores de crescimento podem ser estimulados por meio de sua interação com integrinas, mesmo na ausência da sinalização direta do fator de crescimento (SOMANATH; CIOCEA; BYZOVA, 2009; SOMANATH; MALININ; BYZOVA, 2009).

A associação de $\alpha_v\beta_3$ com VEGFR2 promove a ativação completa de cada receptor, levando à angiogênese máxima em resposta ao VEGF. Estudos iniciais mostraram aumento da fosforilação de VEGFR2 em CEs aderidas em ligantes de $\alpha_v\beta_3$,

tais como vitronectina e fibrinogênio, e que células em suspensão ou aderidas ao colágeno exibiram uma fosforilação deficiente de VEGFR2 em resposta ao VEGF (MAHABELESWAR et al., 2008; SOLDI et al., 1999).

A cooperação entre $\alpha_v\beta_3$ e VEGFR2 é de natureza recíproca: a ativação de um componente leva ao aumento do outro (FIGURA 8) (SOMANATH; MALININ; BYZOVA, 2009). Anticorpos bloqueadores de $\alpha_v\beta_3$ inibiram a fosforilação de VEGFR2, indicando que a fosforilação deste receptor é dependente de $\alpha_v\beta_3$. Outros estudos também mostraram que há uma conexão de sinalização sinérgica entre VEGFR2 e $\alpha_v\beta_3$ em CEs primárias. Esta cooperação se fez necessária para a fosforilação completa do VEGFR2 e para a ativação de vias de motilidade celular, tais como FAK e Src (FIGURA 8) (MAHABELESWAR et al., 2007, 2008; SOLDI et al., 1999). Similarmente, inibidores específicos de VEGFR2 inibiram a formação de complexos entre este receptor e a integrina β_3 , impedindo a ativação de $\alpha_v\beta_3$ (MAHABELESWAR et al., 2007)

FIGURA 8 - $\alpha_v\beta_3$ /VEGFR2 cross-talk



Fonte: SOMANATH; MALININ; BYZOVA, 2009

Possíveis mecanismos responsáveis pela formação do complexo entre o VEGFR2 e a $\alpha_v\beta_3$ na superfície das células endoteliais e as consequências funcionais dessa conexão.

As interações ativas entre $\alpha_v\beta_3$ e VEGFR2 também foram observadas *in vivo*. A imunocoloração de tumores, bem como de tecidos isquêmicos, revelou a

colocalização do VEGFR2 com $\alpha_v\beta_3$ nos vasos sanguíneos. Estudos usando camundongos *knock-in*, os quais expressam a integrina β_3 com dois resíduos de tirosina mutados para fenilalaninas (camundongos DiYF), indicaram que a ativação de $\alpha_v\beta_3$ estimulada por VEGF e FGF foi prejudicada na ausência dessas tirosinas. Estes defeitos resultaram em angiogênese tumoral e em cicatrização comprometida (BYZOVA et al., 2002, 2000; MAHABELESHWAR et al., 2007).

Estas pesquisas demonstraram interconexões funcionais entre $\alpha_v\beta_3$ e VEGFR2 que resultam na regulação positiva da atividade induzida pelo ligante do receptor tirosina quinase 2 pelo acoplamento da integrina, indicando que a compreensão do direcionamento do *cross-talk* pode contribuir para a eficácia das atuais estratégias anti-angiogênicas.

1.8 Terapia anti-angiogênica tumoral

1.8.1 Agentes anti-VEGF

O VEGF é superexpresso na grande maioria dos tumores sólidos e é amplamente considerado um dos principais intervenientes na mediação da angiogênese tumoral. Por esse motivo, nas últimas décadas, o desenvolvimento do tratamento anti-angiogênico foi predominantemente focado nos inibidores de VEGF (RAMJAWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017).

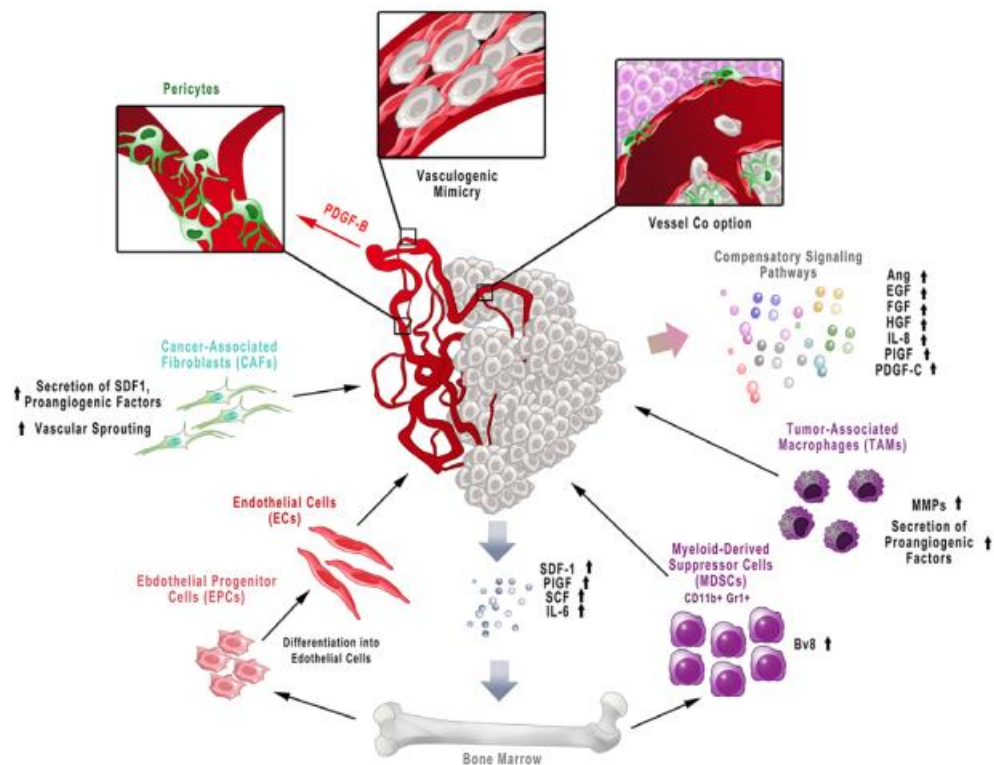
O grupo do Dr. Napoleone Ferrara (Genentech, California) projetou e desenvolveu o primeiro inibidor anti-angiogênico, o Bevacizumab, um anticorpo recombinante monoclonal humanizado bloqueador de VEGF-A (FERRARA; HILLAN; NOVOTNY, 2005; FERRARA; KERBEL, 2005). A administração intravenosa de Bevacizumab depleta os níveis de VEGF na corrente sanguínea, o que inibe a sua interação entre os receptores (WILLETT et al., 2009). Em um ensaio clínico inicial de fase III, o Bevacizumab não melhorou a sobrevida nem diminuiu a progressão tumoral quando associado à quimioterapia no câncer de mama, melanoma, pâncreas e próstata (CORRIE et al., 2014; MILLER et al., 2005), mas foi capaz de aumentar a sobrevida global dos pacientes e/ou a sobrevida livre de progressão tumoral nos cânceres colorretal metastático, pulmonar, ovariano, endometrial e cervical (KABBINAVAR, 2003; RAMJAWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017). A combinação de Bevacizumab com a imunoterapia de interferon alfa (IFN- α) prolongou a sobrevida dos

pacientes, diminuindo a progressão tumoral, sendo este tratamento considerado o padrão atual no carcinoma metastático de células renais (ESCUДИER et al., 2016; RINI et al., 2010).

Outros compostos foram desenvolvidos como inibidores de angiogênese que visam a atividade dos receptores de VEGF, a fim de suprimir a proliferação endotelial e interromper o suprimento vascular de nutrientes e oxigênio. Dentre eles estão os inibidores de tirosina quinase (TKI) e os anticorpos monoclonais. Alguns desses inibidores foram aprovados em ensaios de fase III como monoterapia ou coadjuvante quimioterápico para tratamento de diversos tipos de câncer, e incluem: Sorafenib, Sunitinib, Axitinib, Regorafenib, Pazopanib, Vandetanib, Cabozantinib e Lenvatinib como inibidores TKI e Ramucirumabe como anticorpo monoclonal (RAMJAWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017).

Embora vários outros ensaios clínicos de fase III ainda estejam em andamento, a questão urgente que surge diz respeito à resistência adquirida a essa modalidade de tratamento, pois outros fatores pró-angiogênicos não são bloqueados e a resposta angiogênica é restabelecida, o que resulta em eficiência de 2 a 3 meses de sobrevida média à terapia anti-VEGF (FIGURA 9) (MAJ; PAPIERNIK; WIETRZYK, 2016; RAMJAWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017).

FIGURA 9 - Resistência à terapia anti-angiogênica



Fonte: MAJ; PAPIERNIK; WIETRZYK, 2016

A resistência adquirida à terapia anti-angiogênica pode resultar de alguns mecanismos possíveis: células cancerígenas produzem múltiplos fatores pró-angiogênicos e ativam vias alternativas de sinalização diferentes de VEGF/VEGFR, recrutando células derivadas de medula óssea (MDSCs, EPCs) e células estromais (fibroblastos associados ao câncer e pericitos) para o microambiente.

1.8.2 Inibidores de integrinas

Estudos pré-clínicos sugeriram que os antagonistas de várias integrinas poderiam ser úteis para suprimir a angiogênese e o crescimento tumoral, isoladamente ou em combinação com a terapêutica atual contra o câncer. Os antagonistas de integrinas incluem anticorpos bloqueadores de função, peptídeos sintéticos, pequenas moléculas orgânicas e desintegrinas (AVRAAMIDES et al., 2008; WEIS; CHERESH, 2011).

Os anticorpos monoclonais anti-integrina que bloqueiam a função destes receptores, têm alta afinidade e especificidade e foram bem caracterizados. O anticorpo anti- $\alpha_v\beta_3$ LM609 foi o primeiro antagonista de integrina a chegar à clínica, denominado primeiramente como Vitaxin, após MEDI-522, e está atualmente sendo

desenvolvido pela Astra-Zeneca como Etaracizumab (Abegrin). O Abegrin foi bem tolerado em ensaios de Fase I (DELBALDO et al., 2008) e embora nenhuma resposta objetiva tenha sido observada em estudos de Fase II para melanoma (HERSEY et al., 2010), este anticorpo está sendo testado em ensaios clínicos para tumores sólidos, psoríase e artrite reumatoide. Além disso, o Abegrin® mostrou-se promissor em modelos pré-clínicos como um ligante de direcionamento para agentes de imagem molecular (LIU et al., 2011).

Antagonistas peptídicos cíclicos também foram avaliados em ensaios clínicos. O Cilengitide® foi um dos primeiros fármacos anti-angiogênicos direcionados ao bloqueio da adesão celular à MEC por antagonismo das integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_5\beta_1$. Em estudos de fase I, pacientes com tumores sólidos avançados foram tratados com Cilengitide® sem resultados consistentes (HARIHARAN et al., 2007). O Cilengitide® também foi testado em associação com o Cediranib, um inibidor da tirosina quinase associada ao VEGFR, sendo bem tolerado, mas não promovendo mudanças nas taxas de sobrevida dos pacientes (FRIESS et al., 2006; GERSTNER et al., 2015). Recentemente, 12 pacientes com tumores sólidos foram tratados com Cilengitide®, obtendo-se resposta positiva parcial ao tratamento, já que cinco desses pacientes tiveram a estabilização da progressão do tumor como melhor resposta (HADDAD et al., 2017).

No entanto, após 10 anos de ensaios clínicos com Cilengitide® para diferentes tipos de tumores, os resultados ainda não são favoráveis. Os motivos para a falta de sucesso podem estar relacionados à determinação das doses efetivas e do tempo de administração (ATKINSON et al., 2014; BLANDIN et al., 2015; STERI et al., 2014). Outra razão diz respeito aos efeitos dose-dependentes opostos, em que baixas doses de Cilengitide® têm efeito pró-angiogênico e altas doses, efeito anti-angiogênico (REYNOLDS et al., 2009).

Dentre os inibidores de pequenas moléculas estão as isoxazolininas, os indazolos dissustituídos, e os RGD-não peptídicos (BATT et al., 2000; PITTS et al., 2000; SWENSON; RAMU; MARKLAND, 2007). Um exemplo desta última classe de antagonistas é o S247, o qual bloqueia as integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$, diminuindo o crescimento tumoral, a angiogênese e as metástases de câncer de cólon, prolongando a sobrevivência em um modelo murino ortotópico (REINMUTH et al., 2003).

Os inibidores de pequenas moléculas orgânicas, particularmente os fármacos ativos por via oral, são considerados a terapêutica mais rentável. Entretanto, o desenvolvimento de inibidores seletivos e de elevada afinidade à integrinas é um processo lento e ainda não possui ensaios clínicos (RAMJAWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017).

1.9 Desintegrinas

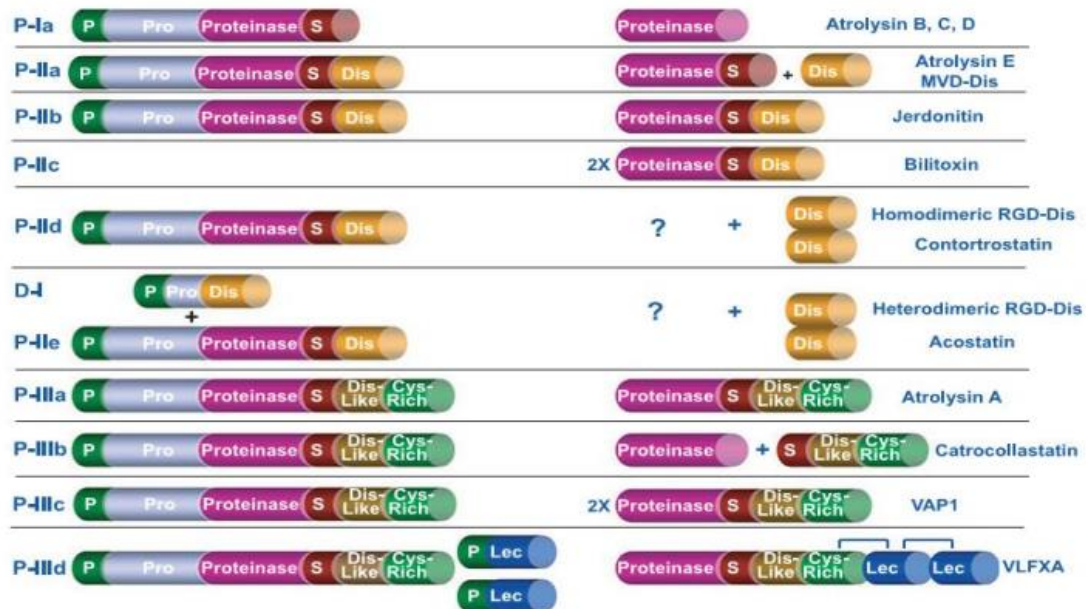
As desintegrinas são uma família de proteínas pequenas, não enzimáticas e ricas em cisteínas, encontradas nos venenos das famílias de serpentes Viperidae, Crotalidae, Atractaspididae, Elapidae e Colubridae (MCLANE et al., 2004). A primeira desintegrina descrita na literatura foi a trigamina, um peptídeo-RGD rico em cisteína, de cadeia única, purificada da peçonha de *Trimeresurus gramineus* (HUANG et al., 1987). A trigamina inibe a adesão de células de melanoma humano à fibronectina e ao fibrinogênio (KNUDSEN et al., 1988). Além disso, sua co-administração *in vivo* com células tumorais inibiu marcadamente o crescimento do tumor e a destruição óssea (YANG et al., 2005). Devido a esses resultados promissores, várias desintegrinas passaram a ser identificadas e caracterizadas funcionalmente e estruturalmente, dando origem a amplas possibilidades de aplicações.

Tipicamente, as desintegrinas são derivadas de precursores proteoliticamente processados, denominados de metaloproteases de veneno de serpentes (SVMPs), os quais são filogeneticamente relacionados com uma desintegrina e metaloprotease (ADAMs) (CALVETE, 2005). Também foi demonstrado que as desintegrinas podem ocorrer como resultado da síntese de RNAm de codificação curta, com base na biblioteca de cDNA de glândulas de veneno sem o domínio metaloprotease (MP) (CALVETE et al., 2005).

As SVMPs são classificadas em três classes (P-I, P-II e P-III) de acordo com sua organização estrutural. Os membros da classe P-I são compostos apenas pelo domínio MP. As proteínas pertencentes à classe P-II possuem o domínio MP e um domínio desintegrina adicional, e as proteínas de classe P-III possuem o domínio MP, um domínio desintegrina-símile e um domínio rico em cisteína, este último sendo substituído, em alguns casos, por um domínio lectina. Além disso, as classes P-II e P-III podem ser subdivididas de acordo com o processamento proteolítico de seus

domínios e sua capacidade de formar estruturas diméricas (FIGURA 10) (CALVETE et al., 2005).

FIGURA 10 - Classes de SVMPs



Fonte: FOX; SERRANO, 2008

As SVMPs são sintetizadas como precursores multimodulares que sofrem diferentes estágios de processamento. P: pré-domínio, Pro: pró-domínio, Proteinase: domínio metaloproteinase, S: sequência de aminoácidos entre o domínio catalítico e desintegrina ou desintegrina-símile, Dis: desintegrina, Dis-Like: domínio desintegrina-símile, Cys-Rich: domínio rico em cisteínas, Lec: domínio ligante de lectina.

Dependendo da classe e do tipo de processamento, as SVMPs originam diferentes desintegrinas que podem ser estruturalmente divididas em monômeros, homodímeros ou heterodímeros. As desintegrinas monoméricas são derivadas do processamento proteolítico da classe P-IIa. Elas possuem baixa massa molecular (5-8 kDa) e contêm o motivo adesivo RGD, assim como motivos similares (KGD, MVD, MGD e WGD). As desintegrinas heterodiméricas são processadas a partir de P-IIe e apresentam o motivo MLD. Algumas delas parecem ser formadas por uma subunidade resultante do processamento proteolítico das SVMPs e outra subunidade obtida a partir de um produto gênico traduzido, o qual representa o domínio desintegrina (CALVETE et al., 2005; FOX; SERRANO, 2008).

As SVMPs de classe P-III dão origem a proteínas desintegrina-símile, formadas por um domínio ativo covalentemente ligado e rico em cisteínas. Estas proteínas, com

massas moleculares em torno de 30 kDa, apresentam o motivo XCD (comumente D/ECD) substituindo o tripeptídeo RGD (CALVETE et al., 2003; FOX; SERRANO, 2008).

As desintegrinas demonstraram ter a capacidade de interagir com integrinas específicas, inibindo suas funções (CALVETE, 2013). Devido a isso, elas também podem ser classificadas de acordo com as integrinas por quem têm afinidade o que é determinado pela presença de um motivo específico de ligação à integrina localizado em uma alça em gancho na região C-terminal da desintegrina. Três classes funcionais contendo motivos RGD, MLD ou R/KTS foram identificadas (CALVETE et al., 2005).

As desintegrinas RGD constituem a maior e a mais investigada família de desintegrinas e inibem as funções fisiológicas das integrinas $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ (CALVETE, 2013; CALVETE et al., 2003). Já o motivo MLD é encontrado apenas em desintegrinas heterodiméricas e medeia a ligação às integrinas $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ e $\alpha_4\beta_7$. Motivos KTS ou RTS no sítio ativo, por sua vez, direcionam seletivamente a atividade das desintegrinas para com a integrina $\alpha_1\beta_1$, um receptor de colágeno. Estruturalmente, as desintegrinas R/KTS são moléculas monoméricas curtas contendo 41 aminoácidos em sua cadeia polipeptídica (WALSH; MARCINKIEWICZ, 2011).

1.10 Desintegrinas RGD anti-angiogênicas

As desintegrinas contendo RGD são encontradas em muitos venenos de serpentes e foram originalmente caracterizadas como inibidores da agregação plaquetária (MCLANE et al., 1998; NIEWIAROWSKI et al., 1994). Elas também foram previamente descritas como inibidores da adesão de células tumorais aos componentes da MEC (TRIKHA et al., 1994).

A primeira desintegrina RGD a ser relatada como anti-angiogênica foi a Triflavina, um polipeptídeo de cadeia única isolado do veneno de *Trimeresurus flavoviridis*. A Triflavina foi capaz de bloquear a adesão, a migração e inibir a angiogênese em HUVECs (SHEU et al., 1997).

Em 1999, Kang e colaboradores publicaram o primeiro trabalho sobre a atividade anti-angiogênica de uma desintegrina recombinante (KANG; LEE; KIM,

1999). Este grupo clonou com sucesso o gene para a Salmosina (uma desintegrina de *Agkistrodon halys brevicaudus*), a qual possui efeitos anti-proliferativos induzidos por FGF e também a capacidade de inibir a angiogênese no modelo de membrana corio-alantóica de ovo de galinha (CAM) (KANG; LEE; KIM, 1999).

Estudos realizados com a Accutina, uma desintegrina isolada da serpente *Agkistrodon acutus*, mostraram seu potente efeito inibitório na adesão de CEs à componentes da MEC e na formação de tubos *in vitro*, além de um efeito anti-angiogênico em modelo de membrana CAM *in vivo* por bloqueio da $\alpha_v\beta_3$ (CHIA et al., 2016).

A desintegrina homodimérica Contortrostatina, obtida a partir do veneno da serpente *Agkistrodon contortrix*, possui atividade anti-invasiva e anti-adesiva em células tumorais e em células endoteliais *in vitro*, ligando-se às integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ e $\alpha_5\beta_1$ e interrompendo a angiogênese induzida por FGF e VEGF. Estudos *in vivo* utilizando a linhagem celular de câncer de mama metastático humano MDA-MB-435 e um modelo ortotópico xenográfico em camundongos nude, revelaram que a Contortrostatina tem potente atividade anti-tumoral e anti-angiogênica (SWENSON; ERNST; MARKLAND, 2005; VERIN et al., 2000).

1.11 DisBa-01

A DisBa-01, uma desintegrina-RGD monomérica recombinante de *Bothrops alternatus* (FIGURA 11), é composta por 78 aminoácidos, os quais formam 6 ligações dissulfeto (12 cisteínas). Ela foi produzida a partir de uma biblioteca de cDNA construída com o RNAm da glândula venenífera de uma única serpente da espécie *Bothrops alternatus*, popularmente conhecida como urutu cruzeiro. Sua massa molecular é de 11,780 Da, na qual está inclusa uma cauda de seis histidinas adicionada a sequência com o objetivo de facilitar o processo de purificação da proteína (RAMOS et al., 2008).

O primeiro trabalho publicado sobre a DisBa-01 contém sua modelagem molecular, além de um ensaio de ressonância plasmônica realizado em conjunto com a subunidade β_3 da integrina $\alpha_v\beta_3$, comprovando a afinidade da desintegrina por esta subunidade (KD:1,6.10⁻⁷ M) (FIGURA 11) (RAMOS et al., 2008).

FIGURA 11 - Sequência nucleotídica da DisBa-01

	▶ <i>pET28a fusion peptide</i>																														
1	ATG	GCC	AGC	AGC	CAT	CAT	CAT	CAT	CAC	AGC	AGC	GGC	CTG	GTG	CCG	CCG	GGC	AGC	CAT	ATG	GCT	AGC	ATG	ACT	GGT	GGA	CAG	CAA	ATG	90	
1	M	G	S	S	H	H	H	H	H	S	S	G	L	V	P	R	G	S	H	M	A	S	M	T	G	G	Q	Q	M	30	
	▶ <i>DisBa-01</i>																														
91	GGT	CGC	GGA	TCC	GGA	AAT	GAA	CTT	TTG	GAG	GCG	GGA	GAA	GAA	TGT	GAC	TGT	GGC	ACT	CCT	GGA	AAT	CCG	TGC	TGC	GAT	GCT	GCA	ACC	TGT	180
31	G	R	G	S	G	N	E	L	L	E	A	G	E	E	C	D	C	G	T	P	G	N	P	C	C	D	A	A	T	C	60
181	AAA	CTG	AGA	CCA	GGG	GCG	CAG	TGT	GCA	GAA	GGA	CTG	TGT	TGT	GAC	CAG	TGC	AGA	TTT	ATG	AAA	GAA	GGA	ACA	GTA	TGC	CGG	ATT	GCA	AGG	270
61	K	L	R	P	G	A	Q	C	A	E	G	L	C	C	D	Q	C	R	F	M	K	E	G	T	V	C	R	I	A	R	90
271	GGT	GAT	GAC	ATG	GAT	GAT	TAC	TGC	AAT	GGC	ATA	TCT	GCT	GGC	TGT	CCC	AGA	AAT	CCC	TTC	CAT	GCC	TAA	339							
91	G	D	D	M	D	D	Y	C	N	G	I	S	A	G	C	F	R	N	P	F	H	A	#	105							

Fonte: RAMOS et al., 2008

Na sequência proteica deduzida, a cauda de histidina está presente no N-terminal da proteína e o motivo RGD (indicado por letras mais claras) próximo ao C-terminal.

Esse mesmo trabalho mostrou que a DisBa-01 inibe a adesão da linhagem celular endotelial microvascular humana (HMEC-1) e da linhagem celular de melanoma murino B16F10 à vitronectina ($IC_{50} = 555$ nM e 225 nM, respectivamente), inibindo transitoriamente suas proliferações sem acarretar em toxicidade celular (RAMOS et al., 2008).

Quando injetada intravenosamente em camundongos C57BL/6 em conjunto com células de melanoma B16F10, a DisBa-01 inibiu, de um modo tempo e dose dependente, a metástase pulmonar (RAMOS et al., 2008). Dessa forma, Ramos e colaboradores concluíram que a DisBa-01 é um potente inibidor dos mecanismos de adesão dependentes de $\alpha_v\beta_3$ envolvidos nos processos de neovascularização e de metástase tumoral (RAMOS et al., 2008). A partir desses resultados, vários outros estudos mostraram os efeitos da DisBa-01 em diferentes modelos experimentais.

A interação da DisBa-01 com a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e seus efeitos sobre a hemostasia e a trombose foram investigados por Kauskot e colaboradores em 2008. Neste estudo foi observado que a desintegrina apresentou efeitos anti-plaquetários e anti-trombóticos (KAUSKOT et al., 2008). Em 2012, Montenegro e colaboradores mostraram que a DisBa-01 oferece suporte à adesão de fibroblastos e células tumorais de mama MDA-MB-231, inibindo a adesão dessas células ao colágeno do tipo I em condições de cisalhamento, não afetando a liberação de VEGF por fibroblastos ou por células MDA-MB-23, mas diminuindo a expressão de VEGF e dos seus receptores VEGFR1 e VEGFR2 em células HMEC-1, modulando também a atividade de MMP-2 e MMP-9 (MONTENEGRO et al., 2012).

Em 2014, Ribeiro e colaboradores testaram concentrações mais altas de DisBa-01 (5 μ M e 10 μ M) em células da linhagem de monócitos/macrófagos (SCs) e em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs). Quando expostas a DisBa-01, as SCs produziram níveis mais elevados de VEGF-A e as HUVECs, de TGF- β . No entanto, as HUVECs também mostraram um aumento da apoptose após perderem suas adesões, processo característico de anoikis (RIBEIRO et al., 2014).

O efeito inibitório dessa desintegrina bloqueadora de $\alpha_v\beta_3$ sobre os componentes angiogênico, inflamatório e fibrogênico do tecido fibrovascular induzido por matriz sintética foi testado em implantes de esponja de poliuretano poliéter em camundongos. DisBa-01 diminuiu os níveis de inflamação, neovascularização e deposição de colágeno através da diminuição dos níveis de atividade de mieloperoxidase, hemoglobina, VEGF, bFGF, TNF- α , CXCL1 e CCL2, indicando o seu potencial terapêutico no controle da angiogênese e de doenças fibroproliferativas (CASSINI-VIEIRA et al., 2014).

O mais recente artigo publicado sobre a DisBa-01 envolveu ensaios *in vitro* *time-lapse* de migração de células escamosas de carcinoma da cavidade oral (OSCC) e indicou que a DisBa-01 (1 e 2 μ M) foi capaz de diminuir a velocidade de migração e a direcionalidade das OSCCs, mas não de fibroblastos. Essa ação ocorre de acordo com o nível de expressão da $\alpha_v\beta_3$ a qual ela se liga e o efeito seletivo está relacionado à modulação das propriedades adesivas das células (MONTENEGRO et al., 2017).

No entanto, sua interação no *cross-talk* entre a integrina $\alpha_v\beta_3$ e o VEGFR2 e sua ação sobre as vias de sinalização de tais receptores ainda não foram exploradas.

2. JUSTIFICATIVA

Os tumores exibem considerável variação no padrão e nas propriedades dos vasos sanguíneos angiogênicos, bem como em suas respostas à terapia anti-angiogênica. A programação angiogênica do tecido neoplásico é um processo multidimensional regulado por células tumorais em conjunto com uma variedade de células estromais associadas a tumores e seus produtos bioativos, que englobam citocinas, fatores de crescimento, matriz extracelular e seus ligantes.

A angiogênese tumoral é predominantemente dirigida pelo VEGF e seu receptor VEGFR2. Os inibidores da via de sinalização do VEGF podem prolongar a sobrevida média dos pacientes com relação à progressão de câncer colorrectal, pulmonar e de mama, quando utilizados em combinação com quimioterapia. No entanto, há um obstáculo negativo: o mecanismo de resistência adquirida à terapia anti-angiogênica.

A angiogênese também é regulada por moléculas de adesão celular endotelial, tais como as integrinas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$. Os inibidores destas integrinas suprimem o crescimento tumoral em certos modelos pré-clínicos, mas não produziram resultados significativos na maioria dos testes experimentais.

Sabe-se que o *cross-talk* entre VEGFR2 e $\alpha_v\beta_3$ é crucial para várias funções celulares. Nas células endoteliais, a interação entre a integrina $\alpha_v\beta_3$ e o VEGFR2 é um processo particularmente importante durante a vascularização e a relação mútua entre os receptores regula várias atividades celulares envolvidas na angiogênese tumoral, incluindo transdução máxima da sinalização dos fatores de crescimento angiogênicos, migração e sobrevivência de células endoteliais, além da formação de tubos. A desativação dessas interações pelo comprometimento do *cross-talk* $\alpha_v\beta_3$ /VEGFR2 poderia melhorar a eficácia das atuais estratégias anti-angiogênicas e potencialmente bloquear um dos mecanismos que contribui para a resistência à terapia.

Considerando que não há dados sobre os efeitos de sinalização das desintegrinas no comprometimento do complexo $\alpha_v\beta_3$ /VEGFR2 e o enorme potencial terapêutico desses peptídeos na inibição da angiogênese, se faz necessário aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos moleculares anti-angiogênicos da

desintegrina DisBa-01 no comprometimento do *cross-talk* entre $\alpha_v\beta_3$ /VEGFR2 e as vias de sinalização a jusante.

3. HIPÓTESE

A DisBa-01 por ter afinidade pela integrina $\alpha_v\beta_3$, a qual está relacionada ao complexo VEGF/VEGFR2 na angiogênese, pode inibir o *cross-talk* entre o receptor e a integrina.

4. OBJETIVOS

Objetivo geral

Verificar os efeitos e o mecanismo de ação da desintegrina DisBa-01 no *cross-talk* entre $\alpha_v\beta_3$ e VEGFR2 sobre a cascata angiogênica em células endoteliais humanas.

Objetivos Específicos

- Analisar a viabilidade, migração, invasão, adesão e tubulogênese sob estimulação do VEGF e tratamento com DisBa-01;
- Avaliar os efeitos da DisBa-01 na expressão de VEGFR2 e $\alpha_v\beta_3$ mediada por VEGF em HUVECs;
- Avaliar os efeitos da DisBa-01 na fosforilação de VEGFR2 e $\alpha_v\beta_3$ mediada por VEGF;
- Analisar a ativação das principais vias de sinalização angiogênica (PI3K e ERK1/2) na presença de DisBa-01 e VEGF;
- Verificar a morfologia das células afetadas pela DisBa-01 e VEGF através de técnicas de microscopia e analisar as vias de sinalização FAK, Src e Paxilina.

Os resultados e a discussão desse trabalho serão apresentados na forma de artigo científico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABHINAND, C. S. et al. VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 10, n. 4, p. 347–335, 2016.
- ALGIRE GH, CHALKLEY HW. Vascular reactions of normal and malignant tissue in vivo. **The Journal of the National Cancer Institute**, v. 6, p. 73–85, 1945.
- ATA, R.; ANTONESCU, C. Integrins and Cell Metabolism: An Intimate Relationship Impacting Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 189, 2017.
- ATKINSON, S. J. et al. Redefining the role(s) of endothelial $\alpha\beta 3$ -integrin in angiogenesis: Figure 1. **Biochemical Society Transactions**, v. 42, n. 6, p. 1590–1595, 2014.
- AVRAAMIDES, C. J. et al. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nature reviews. Cancer**, v. 8, n. 8, p. 604–17, 2008.
- BATT, D. G. et al. Disubstituted indazoles as potent antagonists of the integrin $\alpha(v)\beta 3$. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 41–58, 2000.
- BLANDIN, A. F. et al. $\beta 1$ integrins as therapeutic targets to disrupt hallmarks of cancer. **Frontiers in Pharmacology**, v. 33, n. 7, p. 405-12, 2015.
- BROOKS, P. C. et al. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. **Cell**, v. 79, n. 7, p. 1157–1164, 1994.
- BROOKS, P. C.; CLARK, R. A. F.; CHERESH, D. A. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. **Science**, v. 264, n. 5158, p. 569–571, 1994.
- BYZOVA, T. V. et al. Adenovirus encoding vascular endothelial growth factor-D induces tissue-specific vascular patterns in vivo. **Blood**, v. 99, n. 12, p. 4434–4442, 2002.
- BYZOVA, T. V. et al. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. **Molecular Cell**, v. 6, n. 4, p. 851–60, 2000.
- CALVETE, J. J. et al. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. **The Biochemical journal**, v. 372, n. Pt 3, p. 725–34, 2003.
- CALVETE, J. J. Structure-function correlations of snake venom disintegrins. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 7, p. 829–835, 2005.
- CALVETE, J. J. et al. Snake venom disintegrins: Evolution of structure and function, **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1063-74, 2005.
- CALVETE, J. J. The continuing saga of snake venom disintegrins. **Toxicon**, v. 62, p. 40-9, 2013.
- CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 653-60, 2003.
- CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**, v. 73, n. 7347, p. 298-307, 2011.
- CASSINI-VIEIRA, P. et al. DisBa-01 inhibits angiogenesis, inflammation and fibrogenesis of sponge-induced-fibrovascular tissue in mice. **Toxicon**, v. 92, p. 81–89, 2014.

- CHIA, B. et al. Accutin, a New Disintegrin, Inhibits Angiogenesis In Vitro and In Vivo by Acting as integrin $\alpha v \beta 3$ antagonist and inducing apoptosis. **Blood**, v. 92, n. 9, p. 3268–3276, 1998.
- CLAESSION-WELSH, L. VEGF receptor signal transduction. A brief update. **Vascular Pharmacology**, v. 86, p. 14-17, 2016.
- CORRIE, P. G. et al. Adjuvant bevacizumab in patients with melanoma at high risk of recurrence (AVAST-M): Preplanned interim results from a multicentre, open-label, randomised controlled phase 3 study. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 6, p. 620–630, 2014.
- DAVIS, G. E.; SENGER, D. R. Endothelial extracellular matrix: Biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. **Circulation Research**, v.97, n. 11, p. 1093- 107, 2005.
- DE PALMA, M.; BIZIATO, D.; PETROVA, T. V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v.17, n.8, p. 457-74, 2017.
- DELBALDO, C. et al. Phase I and pharmacokinetic study of etaracizumab (Abegrin), a humanized monoclonal antibody against $\alpha v \beta 3$ integrin receptor, in patients with advanced solid tumors. **Investigational New Drugs**, v. 26, n. 1, p. 35–43, 2008.
- DVORAK, H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 21, p. 4368-80, 2002.
- ELICEIRI, B. P.; CHERESH, D. A. The role of αv integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. **The Journal of Clinical Development**, v. 103, n. 9, p. 1227–12330, 1999.
- ESCUDIER, B. et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. **The Lancet**, v. 370, n. 9605, p. 2103–2111, 2016.
- FERRARA, N. et al. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. **Endocrine Reviews**, v. 13, n. 1, p. 18–32, 1992.
- FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 669–676, 2003.
- FERRARA, N.; HILLAN, K. J.; NOVOTNY, W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 333, n. 2, p. 328-35, 2005.
- FERRARA, N.; KERBEL, R. S. Angiogenesis as a therapeutic target. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 967-74, 2005.
- FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **New England Journal of Medicine**, v. 285, n. 21, p. 1182–6, 1971.
- FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nature medicine**, v. 1, n. 1, p. 27–31, 1995a.
- FOLKMAN, J. Clinical Applications of Research on Angiogenesis. **New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 26, p. 1757–1763, 1995b.
- FOLKMAN, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. **Seminars in Oncology**, v. 29, n. 6Q, p.15, 2002.
- FOLKMAN, J. Fundamental concepts of the angiogenic process. **Current molecular**

medicine, v. 3, n. 7, p. 643–51, 2003.

FOLKMAN, J. Is angiogenesis an organizing principle in biology and medicine? **Journal of Pediatric Surgery**, v. 42, n. 1, p. 1–11, 2007a.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? **Nature reviews. Drug discovery**, v. 6, n. 4, p. 273–86, 2007b.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS Journal**, v. 275, n12, p. 3016-30, 2008.

FRIESS, H. et al. A randomized multi-center phase II trial of the angiogenesis inhibitor Cilengitide (EMD 121974) and gemcitabine compared with gemcitabine alone in advanced unresectable pancreatic cancer. **BMC Cancer**, v. 6, n. 285, p. 1-12, 2006.

GERBER, H. et al. Vascular Endothelial Growth Factor Regulates Endothelial Cell Survival through the Phosphatidylinositol 3⁻Kinase / Akt Signal. **Scientific Reports**, v. 273, n. 46, p. 30336–30343, 1998.

GERSTNER, E. R. et al. A phase I study of cediranib in combination with cilengitide in patients with recurrent glioblastoma. **Neuro-Oncology**, v. 17, n. 10, p. 1386–1392, 2015.

GOLDMANN, E. The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. **Lancet**, v. ii, p. 1236–1240, 1907.

GREENBLATT, M.; PHILIPPE, S. K. Tumor angiogenesis: Transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 41, n. 1, p. 111–124, 1968.

GUERRERO, P. A.; MCCARTY, J. H. Integrins in Vascular Development and Pathology. **Advances in Pharmacology**, v. 81, p. 129-153, 2017.

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

HARIHARAN, S. et al. Assessment of the biological and pharmacological effects of the $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$ integrin receptor antagonist, cilengitide (EMD 121974), in patients with advanced solid tumors. **Annals of Oncology**, v. 18, n. 8, p. 1400–1407, 2007.

HELDIN, C. H.; HELLBERG, C.; ÖSTMAN, A. PDGF and vessel maturation. **Recent Results in Cancer Research**, v. 180, p. 103-14, 2010.

HERSEY, P. et al. A randomized phase 2 study of etaracizumab, a monoclonal antibody against integrin $\alpha(v)\beta(3)$, + or - dacarbazine in patients with stage IV metastatic melanoma. **Cancer**, v. 116, n. 6, p. 1526-32, 2010.

HOEBEN, A. N. N. et al. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. **Pharmacology Reviews**, v. 56, n. 4, p. 549–580, 2004.

HUANG, T. F. et al. Trigramin: A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 33, p. 16157–16163, 1987.

HUNTER, J. The Works of John Hunter, F.R.S. **Cambridge Library Collection v.1, 2015.**

HYNES, R. O. Integrins: A family of cell surface receptors. **Cell**, v. 46, n.4, p.549-54, 1987.

- HYNES, R. O. Integrins : Bidirectional , Allosteric Signaling Machines. **Cell**, v. 110, n.6, p. 673–687, 2002.
- HYNES, R. O.; NABA, A. Overview of the matrisome-An inventory of extracellular matrix constituents and functions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 1, p. a004903, 2012.
- JAIN, R. K. Molecular regulation of vessel maturation. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 685–693, 2003.
- KABBINAVAR, F. Phase II, Randomized Trial Comparing Bevacizumab Plus Fluorouracil (FU)/Leucovorin (LV) With FU/LV Alone in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 1, p. 60–65, 2003.
- KANG, I. C.; LEE, Y. D.; KIM, D. S. A novel disintegrin salmosin inhibits tumor angiogenesis. **Cancer Research**, v. 59, n. 15, p. 3754–3760, 1999.
- KAUSKOT, A. et al. Hemostatic effects of recombinant DisBa-01, a disintegrin from *Bothrops alternatus*. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 13, p. 6604–6616, 2008.
- KLAGSBRUN, M. Regulators of angiogenesis: Stimulators, inhibitors, and extracellular matrix. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 199-200, 1991.
- KNUDSEN, K. A. et al. Trigramin, an RGD-containing peptide from snake venom, inhibits cell-substratum adhesion of human melanoma cells. **Experimental Cell Research**, v. 179, n. 1, p. 42–49, 1988.
- LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 141, n. 7, p. 1117-34, 2010.
- LIU, Z. et al. Specific targeting of human integrin $\alpha\beta 3$ with 111in-labeled abegrinTM in nude mouse models. **Molecular Imaging and Biology**, v. 13, n. 1, p. 112–120, 2011.
- MAHABELESWAR, G. H. et al. Mechanisms of integrin-vascular endothelial growth factor receptor cross-activation in angiogenesis. **Circulation Research**, v. 101, n. 6, p. 570–580, 2007.
- MAHABELESWAR, G. H. et al. Integrin affinity modulation in angiogenesis. **Cell Cycle**, v. 7, n. 3, p. 335–347, 2008.
- MAJ, E.; PAPIERNIK, D.; WIETRZYK, J. Antiangiogenic cancer treatment : the great discovery and greater complexity. **International Journal of Oncology**, v. 49, n.5, p. 1773–1784, 2016.
- MCLANE, M. A. et al. Viper Venom Disintegrins and Related Molecules. **Experimental Biology and Medicine**, v. 219, n. 2, p. 109–119, 1998.
- MCLANE, M. A. et al. Disintegrins. **Current drug targets. Cardiovascular & haematological disorders**, v. 4, n. 4, p. 327–355, 2004.
- MILLER, K. D. et al. Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 4, p. 792–799, 2005.
- MIRANTI, C. K.; BRUGGE, J. S. Sensing the environment: A historical perspective on integrin signal transduction. **Nature Cell Biology**, v. 4, n. 4, 2002.
- MONTENEGRO, C. F. et al. Blocking $\alpha\beta 3$ integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. **Biochimie**, v. 94, n. 8, p. 1812–1820, 2012.

- MONTENEGRO, C. F. et al. Inhibition of $\alpha\beta3$ integrin induces loss of cell directionality of Oral Squamous Carcinoma Cells (OSCC). **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0176226, 2017.
- NIEWIAROWSKI, S. et al. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Seminars in hematology**, v. 31, n. 4, p. 289–300, 1994.
- NISHIDA, N. et al. Angiogenesis in cancer. **Vascular Health and Risk Management**, v.2, n.3, 213-9, 2006.
- OLSSON, A.-K. et al. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 7, n. 5, p. 359–371, 2006.
- PITTS, W. J. et al. Isoxazolines as potent antagonists of the integrin $\alpha(v)\beta3$. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 27–40, 2000.
- POTENTE, M.; GERHARDT, H.; CARMELIET, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 873–887, 2011.
- RAMJAWAN, R. R.; GRIFFIOEN, A. W.; DUDA, D. G. Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy? **Angiogenesis**, v. 20, n.2 , p. 185-204, 2017.
- RAMOS, O. H. P. et al. A novel $\alpha\beta3$ -blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 25, n. 1, p. 53–64, 2008.
- REINMUTH, N. et al. $\alpha\beta3$ integrin antagonist S247 decreases colon cancer metastasis and angiogenesis and improves survival in mice. **Cancer Research**, v. 63, n. 9, p. 2079–2087, 2003.
- REYNOLDS, A. R. et al. Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors. **Nature Medicine**, v. 15, n. 4, p. 392–400, 2009.
- RIBATTI, D. Judah Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 11, n. 1, p. 3–10, 2008.
- RIBEIRO, L. C. A. et al. Recombinant disintegrin targets $\alpha(v)\beta(3)$ integrin and leads to mediator production. **Cells Adhesion & Migration**, v. 8, n. 1, p. 60–65, 2014.
- RINI, B. I. et al. Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa versus interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: final results of CALGB 90206. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 28, n. 13, p. 2137–43, 2010.
- RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v. 386, p. 671–674, 1997.
- ROCHA, L. A. et al. $\alpha\beta3$ and $\alpha5\beta1$ integrin-specific ligands: From tumor angiogenesis inhibitors to vascularization promoters in regenerative medicine? **Biotechnology Advances**, 2017.
- ROHLENOVA, K. et al. Endothelial Cell Metabolism in Health and Disease. **Trends in Cell Biology**, 2017.
- ROSKOSKI, R. VEGF receptor protein-tyrosine kinases: Structure and regulation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 375, n. 3, p. 287–291, 2008.
- SHEN, B.; DELANEY, M. K.; DU, X. Inside-out, outside-in, and inside-outside-in: G protein signaling in integrin-mediated cell adhesion, spreading, and retraction. **Current**

Opinion in Cell Biology, v. 24, n. 5, p. 600-6, 2012.

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- $\alpha(v)\beta_3$ integrin monoclonal antibody. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1336, p. 445–454, 1997.

SIA, D. et al. VEGF signaling in cancer treatment. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 17, p. 2834–2842, 2014.

SIMONS, M.; GORDON, E.; CLAESSION-WELSH, L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n.10, p. 611-25, 2016.

SMITH, G. A. et al. The cellular response to vascular endothelial growth factors requires co-ordinated signal transduction, trafficking and proteolysis. **Bioscience Reports**, v. 35, n. 5, p. 1–15, 2015.

SOLDI, R. et al. Role of $\alpha v\beta_3$ integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. **The EMBO journal**, v. 18, n. 4, p. 882–92, 1999.

SOMANATH, P. R.; CIOCEA, A.; BYZOVA, T. V. Integrin and growth factor receptor alliance in angiogenesis. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 53, n. 2, p. 53–64, 2009.

SOMANATH, P. R.; MALININ, N. L.; BYZOVA, T. V. Cooperation between integrin $\alpha v\beta_3$ and VEGFR2 in angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 12, n. 2, p. 177-85, 2009.

SRICHAJ, M. B.; ZENT, R. Integrin structure and function. In: Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer. **Springer**, p. 19–41, 2010.

STERI, V. et al. Acute depletion of endothelial β_3 -integrin transiently inhibits tumor growth and angiogenesis in mice. **Circulation Research**, v. 114, n. 1, p. 79–91, 2014.

SWENSON, S.; ERNST, W.; MARKLAND, F. S. Contortrostatin, a Snake Venom Disintegrin with Anti-Angiogenic and Anti-Tumor Activity. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, v. 34, n. 5, p. 169–176, 2005.

SWENSON, S.; RAMU, S.; MARKLAND, F. S. Anti-Angiogenesis and RGD-Containing Snake Venom Disintegrins. **Toxicon**, v. 78, p. 2860–2871, 2007.

TOI, M.; MATSUMOTO, T.; BANDO, H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. **The Lancet Oncology**, v. 2, n. 11, p. 667–673, 2001.

TRIKHA, M. et al. Purification and characterization of platelet aggregation inhibitors from snake venoms. **Thrombosis research**, v. 73, n. 1, p. 39–52, 1994.

TUCKER, G. C. Integrins: molecular targets in cancer therapy. **Current Oncology Reports**, v. 8, n. 2, p. 96–103, 2006.

VERIN, A. D. et al. Contortrostatin, a snake venom disintegrin, induces $\alpha v\beta_3$ -mediated tyrosine phosphorylation of CAS and FAK in tumor cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 79, n. 1, p. 28–37, 2000.

WALSH, E. M.; MARCINKIEWICZ, C. Non-RGD-containing snake venom disintegrins, functional and structural relations. **Toxicon**, v. 58, n. 4, p. 355-62, 2011.

WEIS, S. M.; CHERESH, D. A. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. **Nature**, v. 437, n. 7058, p.497-504, 2005.

WEIS, S. M.; CHERESH, D. A. Tumor angiogenesis: Molecular pathways and

therapeutic targets. **Nature Medicine**, v. 17, n. 11, p. 1359-70, 2011a.

WEIS, S. M.; CHERESH, D. A. α_v integrins in angiogenesis and cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, 2011b.

WILLETT, C. G. et al. Efficacy, safety, and biomarkers of neoadjuvant bevacizumab, radiation therapy, and fluorouracil in rectal cancer: A multidisciplinary phase II study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 18, p. 3020–3026, 2009.

YANG, R.-S. et al. Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin. **Toxicon**, v. 45, n. 5, p. 661–9, 2005.

YANG, W.-H. et al. Revision of the concept of anti-angiogenesis and its applications in tumor treatment. **Chronic Diseases and Translational Medicine**, v. 3, n. 1, p. 33–40, 2017.

ZECCHIN, A. et al. How endothelial cells adapt their metabolism to form vessels in tumors. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 1750, p. 1-8, 2017.

6. MANUSCRITO EM FASE DE REDAÇÃO

DisBa-01 blocks integrin $\alpha_v\beta_3$ and impairs VEGF signaling

Taís M. Danilucci^a; Patty K. Santos^a; Bianca C. Pachane^a; Graziéle F. D. Pisani^a; Rafael B. Lino^a; Bruna C. Casali^a; Heloisa S. Selistre-de-Araujo^{ab}.

^aDepartment of Physiological Sciences, Center of Biological and Health Sciences, Federal University of São Carlos, Rod. Washington Luis, km 235 - SP-310 - São Carlos, São Paulo, Brazil, CEP 13565-905.e-mail: hсараујо@ufscar.br

^bCorresponding author: Heloisa Sobreiro Selistre-de-Araujo

Department of Physiological Sciences, Center of Biological and Health Science, Federal University of São Carlos, Rod. Washington Luis, km 235 - SP-310 - São Carlos, São Paulo, Brazil, CEP 13565-905. e-mail: hсараујо@ufscar.br. orcid.org/0000-0002-2372-7814.

RUNNING TITLE: inhibition of $\alpha_v\beta_3$ /VEGFR2 cross-talk.

Abstract

Integrins mediate cell adhesion, migration, and survival by connecting the intracellular machinery with the surrounding extracellular matrix. Previous studies demonstrated the importance of the interaction between $\alpha_v\beta_3$ integrin and VEGF type 2 receptor (VEGFR2) in VEGF-induced angiogenesis. DisBa-01, a recombinant His-tag fusion RGD-disintegrin from *Bothrops alternatus* snake venom has high-affinity and blocks $\alpha_v\beta_3$ integrin. Here we present in vitro evidence of the direct association of DisBa-01 with $\alpha_v\beta_3$ /VEGFR2 cross-talk and its downstream pathways. We found that addition of DisBa-01 to endothelial cells from human umbilical vein (HUVECs) inhibited all steps of VEGF-mediated angiogenesis. Regarding DisBa-01, a possible mechanism of action for the impairment of $\alpha_v\beta_3$ /VEGFR2 cross-talk by this disintegrin is the modulation of expression and phosphorylation of VEGFR2 and β_3 . This impairment leads to the inhibition of ERK1/2 and PI3K pathways and regulates FAK/Src/Paxillin downstream signal, significantly affecting actin re-organization and modulating HUVEC migration and adhesion. In conclusion, $\alpha_v\beta_3$ /VEGFR2 cross-talk is impaired by DisBa-01, which modifies the angiogenic mechanism.

Keywords: $\alpha_v\beta_3$ integrin, VEGFR2, cross-talk, disintegrin, DisBa-01

1. INTRODUCTION

Angiogenesis, the development of new capillaries from preexisting blood vessels, is an essential process in the regulation of several physiological and pathological processes. Inadequate balance between pro-angiogenic and anti-angiogenic factors may lead to pathological conditions, notably in tumor development and metastasis. Also, a range of non-neoplastic diseases could be classified as 'angiogenesis-dependent diseases' such as diabetic retinopathy, rheumatoid arthritis, atherosclerosis and various inflammation diseases (FOLKMAN, 1995, 2007).

Tumor angiogenesis is predominantly driven by vascular endothelial growth factor (VEGF), a proangiogenic growth factor expressed by several solid cancers. VEGF stimulates angiogenesis through VEGF receptor-2 (VEGFR2), a tyrosine kinase receptor expressed by endothelial cells (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; RAMJIWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017). VEGF-A/VEGFR2 signaling stimulates a myriad of intracellular signaling pathways such as activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), extracellular-signal-regulated kinase (Erk) pathway, focal adhesion kinase (FAK), c-Src family and paxillin (ABHINAND et al., 2016; ZACHARY, 2003). The activation of such pathways results in a wide range of cell responses including increased vessel permeability and remodeling, endothelial cell proliferation, migration, tubulogenesis, secretion of matrix metalloproteinases (MMPs) and nitric oxide (NO) and prostanoids synthesis (SMITH et al., 2015; ZACHARY, 2003). This synchronized signaling network, also associated with the cross-talking with integrin receptors, modulates the angiogenic response and it is fundamental for tumor blood supply and growth (COMOGLIO; BOCCACCIO; TRUSOLINO, 2003; ROSS, 2004).

Integrins comprise a family of heterodimeric transmembrane receptors that mediates cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) interactions, regulating cell survival, proliferation, adhesion and migration (HYNES, 1987, 2002). Some members of the integrin family present in endothelial cells, such as $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, and $\alpha_v\beta_5$ integrins, are up-regulated during vascular remodeling and growth associated with inflammation, wound healing, ischemic injury, tumor growth and metastasis (BYZOVA et al., 2000; SOMANATH; MALININ; BYZOVA, 2009).

The $\alpha_v\beta_3$ integrin is one of the most abundant key receptor regulating angiogenesis in endothelial cells due to its cross-talk with VEGFR2 (BRAKENHIELM, 2007; OLSSON et al., 2006). Phosphorylation of VEGFR2 is enhanced when endothelial cells are plated on ECM proteins such as vitronectin and fibrinogen, which are ligands for integrin $\alpha_v\beta_3$ (SOLDI et al., 1999). Moreover, functional interconnections were demonstrated between $\alpha_v\beta_3$ integrin and VEGFR2, resulting in up-regulation of the ligand-induced tyrosine kinase receptor activity by integrin engagement (MAHABELESWAR et al., 2007, 2008; WEST et al., 2012). In vitro experiments have shown that $\alpha_v\beta_3$ integrins are up-regulated by VEGF-A in microvascular endothelial cells, alongside its elevated levels at active angiogenic sites (ELICEIRI; CHERESH, 1999; SENGER et al., 1996). Understanding how to target these crosstalk events could improve the effectiveness of current anti-angiogenic strategies.

Antibodies directed to integrins and small inhibitors such as RGD cyclic peptides successfully prevent angiogenesis by inhibiting ligand binding to the integrin with subsequent blockage of adhesive functions of $\alpha_v\beta_3$ integrin (FELDING-HABERMANN et al., 2001; KANG; LEE; KIM, 1999a; SWENSON; ERNST; MARKLAND, 2005; SWENSON; RAMU; MARKLAND, 2007; TOME et al., 2016; YEH et al., 2001; ZAKRAOUI et al., 2016). As an example, families of small cysteine-rich proteins, mostly having the adhesive RGD motif, named disintegrins, were described from snake venom sources (CALVETE, 2005). The RGD-disintegrins are potent antagonists of some integrins such as $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ (NIEWIAROWSKI et al., 1994) and have anti-tumor and anti-angiogenic actions (SWENSON; RAMU; MARKLAND, 2007).

DisBa-01, a recombinant His-tag fusion, RGD-disintegrin from *Bothrops alternatus* snake venom, has shown high-affinity towards $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrins, leading to strong anti-platelet and anti-thrombotic effects (RAMOS et al., 2008). Also, DisBa-01 inhibits tumor cell migration speed and directionality and decreases VEGF receptors expression in HMEC-1 cells (Human Microvascular Endothelial Cells) (MONTENEGRO et al., 2012, 2017). In addition, *in vivo* assays showed that DisBa-01 inhibited both angiogenesis and lung metastasis in animal models (CASSINI-VIEIRA et al., 2014; RAMOS et al., 2008).

Considering the extent of therapeutic potential of disintegrins in angiogenesis inhibition and there is no further data on the signaling effects of this class of peptides

on the cross-talk between VEGFR2 and $\alpha_v\beta_3$, it is necessary to deepen the knowledge about the molecular mechanisms of the action of DisBa-01 in the $\alpha_v\beta_3$ /VEGFR2 impairment. Here we showed for the first time, a new anti-angiogenesis mechanism of DisBa-01 by down-regulation of $\alpha_v\beta_3$ /VEGFR2 cross-talk and signaling. Our results achieve to a better comprehension on disintegrins role in angiogenesis.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 DisBa-01 Expression and Purification

Recombinant disintegrin DisBa-01, a His-tag protein (GenBank accession AY259516) was produced from a cDNA venom gland library of a *Bothrops alternatus* snake, as previously described (RAMOS et al., 2008). Strains of *Escherichia coli* BL21 (DE3) were transformed with a pET28-a plasmid containing the DisBa-01 gene. Bacterial liquid culture was grown before expression assays were performed. Cell lysis extract was purified in a three-step chromatographic process, using an affinity column (HIS-Select[®] Nickel Affinity Gel, Sigma-Aldrich[®]), followed by a size-exclusion chromatography (Superdex 75 10/300 GL, GE Healthcare) and an anion exchange column (Mono-Q 5/50 GL, GE Healthcare). Total protein was determined by colorimetric detection of bicinchoninic acid assay (Pierce[™] BCA Protein Assay, Thermo Scientific). Protein activity was determined by inhibition of adhesion to vitronectin assay using B16F10 cell line, according to Ramos (RAMOS et al., 2008).

2.2 Cell Culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC, American Type Culture Collection [ATCC[®] CRL-1730]) were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Vitrocell) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Nutricell), penicillin (10.000 U.I./mL) and streptomycin (10 mg/mL) (Vitrocell). Cells were maintained incubated at 37 °C, on atmosphere with 5% CO₂. Subcultures of cells were performed as instructed by the supplier, using trypsin-EDTA. Cells were used between passages 8 to 15 and counted on a TC20 automated cell counter (Bio-Rad) using trypan blue stain solution at 0.4% (Thermo Scientific).

2.3 Cell Viability

Cell viability was observed in a 96-well plate, where HUVECs (5×10^3 cells/well) were plated on serum-supplemented medium and left to adhere for 24 h on incubator. A 24-hour starvation period on serum-free DMEM occurred, followed by the treatment of cells with DisBa-01 (1000 nM/ml) and/or VEGF (10 ng/ml). Proliferation was allowed for 24 h at 37 °C, 5% CO₂. Viable cells were identified using MTT solution (0.5 mg/ml of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, ThermoFisher Scientific) for 3.5 h. Samples were diluted in isopropanol for measurement of cell concentration by spectrophotometry SpectraMax i3x (OD_{540 nm}, Molecular Devices).

2.4 Transwell Migration Assay

The ability of cells to migrate was tested in a transwell assay, using a ThinCert™ translucent PET membrane RoTrac®, 8.0 µm pore (Greiner Bio-one®). HUVECs (1×10^5 cells/well) were exposed to DisBa-01 (1, 10, 100 and 1000 nM/ml), VEGF (10 ng/ml) or VEGF plus DisBa-01 (1000 nM/ml) and immediately inserted into the Boyden's chamber. The chambers were immersed in 10% FBS medium and allowed to migrate for 6 h at 37 °C. As negative control, chambers were inserted on serum-free medium and incubated as indicated above. Migrated cells were fixated on the membranes with 4% paraformaldehyde and its nuclei were stained in DAPI solution (0.7 ng/µl). Membranes were assembled in histological slides using Vectashield® mounting media (Vector Laboratories) for automated cell counting on ImageXpress Micro microscope (Molecular Devices).

2.5 Cell Invasion Assay

Cell invasion was tested using a 24-well plate Matrigel™ invasion chamber (Corning) previously hydrated with serum-supplemented DMEM. HUVECs (2×10^5 cells/well) were treated with 1000 nM/ml DisBa-01 and/or VEGF (10 ng/ml) on serum-free DMEM medium for 30 min at 4 °C. Cells were pipetted into the Boyden's chamber whilst it was inserted on well containing DMEM 10% FBS. The negative control comprised of serum-free DMEM on the wells. Invasion was allowed to occur for 18 h at 37 °C. After that, samples were fixed in 4% paraformaldehyde and cell nuclei were stained with DAPI (0.7 ng/µl). Using Vectashield® mounting media (Vector Laboratories), membranes were assembled into slides for cell counting on automated fluorescence microscope system, ImageXpress Micro (Molecular Devices).

2.6 Inhibition of Adhesion Assay

HUVECs inhibition of adhesion to fibronectin (FN) and vitronectin (VN) was determined in an assay using a 96-well black plate whose wells were pre-coated with either solution (0.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, Sigma-Aldrich). The negative control comprised coating of 2% BSA. Non-specific binding was blocked with 1% BSA for 1 h at 37 °C, 5% CO₂. After its removal, wells were washed with PBS. Meanwhile, HUVECs (1 x 10⁵ cells/well) were treated with DisBa-01 (1000 nM/ml) and/or VEGF (10 ng/ml) and immediately seeded in their respective wells. Cells were allowed to adhere for 1 h at 37 °C, 5% CO₂. Wells were extensively washed with PBS before fixation using 4% paraformaldehyde solution (pH 7.5) for 15 min. Cell nuclei were stained with DAPI (0.7 ng/ μl) and counted automatically using ImageXpress (Molecular Devices).

2.7 Endothelial Cell Tube Formation Assay

Tubulogenesis assay on Matrigel was performed to evaluate the effect of DisBa-01 on HUVECs tube formation. According to the manufacturer's instructions, Matrigel solution (Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix, *LDEV-Free) was thawed in a refrigerator at 4 °C overnight. Wells of a pre-cooled 96-well plate was coated with Matrigel (35 $\mu\text{l}/\text{well}$), followed by immediate placement in a humidified CO₂ incubator at 37 °C for 1 h for coating solidification. HUVECs (3 x 10⁴ cells/well) were treated for 30 minutes with VEGF (10 ng/ml, PeproTech), DisBa-01 (1, 10, 100 and 1000 nM/ml) or VEGF plus DisBa-01 (1000 nM/ml) in DMEM containing 0.5% FBS and then seeded on the solidified Matrigel. The plate was placed in a humidified CO₂ incubator at 37° C for 14 h to allow the formation of tubes. Images were photographed using the AxionVision Rel.4.8 software of a Vert.A1 microscope (Zeiss) and analyzed using the Angiogenesis Analyzer plugin for ImageJ software (version 1.51n).

2.8 Flow Cytometry

HUVECs (5 x 10⁵/well) were seeded in 6-well plates with DMEM 10% FBS, followed by a 24-hour starvation period on serum-free medium. Cells were treated with DisBa-01 (1000 nM/ml) and/or VEGF (10 ng/ml) for 24 h. The characterization of $\alpha_v\beta_3$ integrin and its subunits (α_v and β_3) in HUVECs was measured by flow cytometry using specific fluorescent-labeled antibodies. Cells (1 x 10⁶) were incubated with anti-integrin

β_3 antibody (human anti-mouse, 1 μ g, Santa Cruz) at 4 °C for 40 min, followed by wash with PBS and centrifugation at 4 °C for 10 min at 1300 rpm. Then, 0.5 mg of secondary antibody (goat anti-mouse IgG, Biosciences BD) labeled with the fluorophore FITC (Fluorescein Isothiocyanate, 2.5 μ l/tube) was added to each sample and incubated for 45 min at 4 °C in the dark. Cells were washed with PBS, centrifuged and analyzed with Accuri flow cytometer (BD Biosciences).

2.9 Gene Expression by Quantitative PCR

RNA extraction started with the plating of HUVECs (5×10^5 /well) in 6-well plates with DMEM 10% FBS, followed by a 24-hour starvation period on serum-free medium. Cells were treated with DisBa-01 (1000 nM/ml) and/or VEGF (10 ng/ml) for 24 h and collected for RNA extraction using TRIZOL reagent (Invitrogen). Total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions. RNA pellet was resuspended in nuclease-free water and stored at -80 °C. Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) was used for measuring the RNA concentration and purity (260/280nm and 260/230nm ratios). RNA (1 μ g) was treated with Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Invitrogen) and *iScriptTM cDNA Synthesis* (BioRad Laboratories) was used for reverse transcription according to the manufacturer's specifications. CFX 96 real-time PCR detection system (Bio-Rad) was used for qPCR reaction. Each reaction used 20 ng of cDNA, 400 nM of each primer and 5 μ l of SsoFastTM Evagreen Supermix (Bio-Rad) in a total volume of 10 μ l per reaction. Gene specific primers purchased from Sigma Aldrich and Exxtend are listed in Table 1. The thermal cycling program was set for 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C, 30 s at 60 °C and 30 s at 72 °C. After the run, the melting curve was analyzed to confirm the specificity of the amplification products. GAPDH was used as a housekeeping gene. The relative expression of qRT-PCR products was determined through $\Delta\Delta C_t$ method, in which relative expression was calculated using the following equation: fold induction = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Table 1. List of primers used for qRT-PCR

Genes	Sense primer (5'-3')	Antisense primer (3'-5')	Source
KDR	GTACATAGTTGTCGTTGTAGG	TCAATCCCCACATTTAGTTC	Sigma Aldrich
ITGB-3	CTCCGGCCAGATGATCC	TCCTTCATGGAGTAAGACAG	Sigma Aldrich
GAPDH	GACTTCAACAGCGCGACACCCAC	CACCACCCTGTTGCTGTAG	Exxtend

2.10 Western Blot

HUVECs (5×10^5 cells/well) were seeded in 6-well plates and left to adhere on an incubator at 37 °C, 5% CO₂, overnight, followed by a period of 24 h of starvation at serum-free medium. Cells were treated with 1 ml of DMEM supplemented with 10% FBS and either DisBa-01 (1000 nM/ml), VEGF (10 ng/ml; PeproTech) or a co-treatment and incubated for 1 and 24 h at 37 °C, 5% CO₂. Cell lysis was performed using 100 µl of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 1% Tween 20, 0.25% sodium deoxycholate, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 µg/ml aprotinin and 1 µg/ml leupeptin) and the cell lysates were centrifuged at 14000 g, 4 °C for 20 min. Protein content of the supernatant was determined by a BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

Cellular proteins (20 µg) were separated on a 20% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes (0.45 µm; Bio-Rad) and blocked with Tween-TBS buffer (140 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 25 mM Tris, pH 7.4, 0.05% Tween 20) plus 5% powdered milk. Western Blot was performed using the antibodies anti-phospho-ERK1 + ERK2^{Y187} (1:500; Abcam), anti-phospho-PI3K^{Y607} (1:1000; Abcam), anti-phospho-VEGFR2^{Y1054+Y1059} (0.5 µg/ml; Abcam), anti-phospho-Src^{Tyr418} (1:1000; Abcam), anti-phospho-paxillin (1:1000; Abcam), anti-phospho-β₃^{Y773} (1:1000; Abcam) and anti-phospho-FAK^{Y397} (1:1000; Abcam) and revealed with a Chemiluminescent Reagent (Sigma Aldrich). After that, membranes passed through stripping and GAPDH (1:1000; Abcam) was used as housekeeping antibody.

Bands were visualized on a molecular imager (ChemiDoc™ XRS; Bio-Rad). At least three experiments in triplicate were performed for each protein and the bands were quantified by densitometric analysis using ImageJ FIJI program.

2.11 Immunofluorescence Assay

HUVECs (3×10^4 cells/well) were plated in a 96-well Microplate μ Clear[®] Black CellStar[®] (Greiner bio-one), previously coated with fibronectin (1 μ g/ml), in serum-free DMEM and incubated overnight at 37 °C, 5% CO₂. Cells were exposed to VEGF (10 ng/ml; PeproTech), DisBa-01 (1000 nM/ml) and VEGF plus DisBa-01 for 30 min in DMEM 10% FBS. Afterwards, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 minutes, blocked for 1 h with 1% BSA and incubated for 2 h with primary antibody VEGFR2 (3 μ g/ml; Abcam) diluted in 1% PBS-BSA. HUVECs were incubated with secondary antibody (Goat anti-Rabbit IgG APC; 1:1000; Abcam) diluted in 1% PBS-BSA for 1 h. Wells were washed with PBS (3x) before and after the staining protocol, in which samples were stained with 0.7 μ g/ml DAPI (Thermo Fisher Scientific) for 10 min.

Fluorescent samples were observed using ImageXpress (Molecular Devices) equipment with 60x magnification and fluorescence intensity of all analysed groups was calculated as vesicle count per nuclear count using the Transfluor Module of the MetaXpress software.

2.12 Colocalization Assay

HUVECs (3×10^4 cells/well) were plated in 8-well Nunc[™] Lab-Tek[™] Chamber Slide System (Thermo Scientific), previously coated with fibronectin (1 μ g/ml), in serum-supplemented DMEM and left overnight in an incubator at 37 °C, 5% CO₂. Cell treatment occurred with Cilengitide (1000 nM/ml, Sigma-Aldrich) for 30 min, followed by wash in PBS. For 5 min, 1000 nM/ml of DisBa-01, previously labeled using Alexa Fluor[®] 546 dye (Invitrogen, Thermo Scientific), were added to the treated cells. Samples were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min and permeabilized using 0.3% Triton X-100 for 10 min. In order to block free aldehydes, Glycine (100 nM, Sigma) was added to each well. Samples were washed with PBS (3 washes, 5 min each), followed by a 1-hour incubation in 2% PBS-BSA to block unspecific sites. Targeted primary antibodies (3 μ g/ml Rabbit pAb to VEGF Receptor 2; 1:250 Mouse Monoclonal to the integrin $\alpha_v\beta_3$, Abcam) were centrifuged at 10,000 g for 1 h at 4 °C and pipetted into the wells. Then, secondary antibodies (1:1000 Goat anti-Rabbit IgG APC, Abcam; 1 μ g/ml Goat polyclonal anti-mouse Alexa 488, ThermoFisher Scientific) were mixed in 2% PBS-BSA and centrifuged at 10,000 g, 1 h, 4 °C before applied on the wells. After incubation, slides were cleaned and samples were stained with 0.7 μ g/ml DAPI (Thermo Fisher Scientific) for 15 min. Slides were assembled using ProLong[™]

Antifade Reagents for Fixed Cells (Thermo Fisher Scientific) and observed on confocal microscope Axio Observer LSM 780 (Zeiss) aided by ZEN BLACK software. Analysis occurred under the same laser intensity for different fluorescence at 63x magnification, zoomed 2x, using ImageJ FIJI program.

2.13 Statistical Analysis

Data were obtained from at least three independent series of experiments and analyses were performed using the statistical program GraphPad Prism (version 5.0). Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) and intergroup comparisons were made using One-way ANOVA with Bonferroni as post hoc and t test (parametric). Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3 RESULTS

3.1 DisBa-01 blocks several critical steps in angiogenesis

The association between $\alpha_v\beta_3$ and the extracellular matrix is crucial for the start of the angiogenic pathway. VEGF signalling and integrin-induced mechanisms promote angiogenesis modulation by controlling endothelial cell responses. Four different experiments were designed to explore how DisBa-01 inhibits the angiogenic mechanism. We have stimulated HUVECs with VEGF, treated with DisBa-01 and verified the changes on viability, migration, invasion and adhesion to ECM components.

Cell viability was stimulated by VEGF (34.5%) after a 24-hour incubation period. DisBa-01 significantly inhibited VEGF-induced viability by 61% and when compared with untreated group, DisBa-01 inhibited cell viability by 26%. In cells that were not treated with VEGF, the disintegrin showed no effects on the viability response (Figure 1). Ribeiro et al. 2014, showed that DisBa-01 (5 μ M and 10 μ M) did not affect the viability of HUVECs and not cause apoptosis.

Cells exposed to DisBa-01 (100 and 1000 nM) exhibited significant decrease in cell migration (43% and 49%, respectively) (Figure 2B), as expected for a disintegrin. VEGF did not alter cell migration, however, in the presence of both VEGF and DisBa-01 (1000 nM), this cellular behaviour was diminished by 69% (Figure 2A-C) and 64%

in comparison with untreated group. DisBa-01 inhibition is enhanced in the presence of VEGF.

HUVEC invasion was significantly inhibited after 18 h by DisBa-01 (58%) (Figure 3). VEGF did not modify cell invasion, however in the presence of both VEGF and DisBa-01 (1000 nM), HUVEC invasion was decreased in 52% (Figure 3).

Integrin $\alpha_v\beta_3$ is a multifunctional receptor that binds to at least four RGD-containing adhesive proteins, including VN and FN. We sought to determine how DisBa-01 interferes with HUVEC adhesion to VN and FN. Although there was an increase in cell adhesion to VN when exposed to DisBa-01, the disintegrin inhibited this effect in VEGF-treated HUVECs (41%) (Figure 4). Neither the disintegrin or the growth factor affected cell adhesion to FN (data not show).

These results support the hypothesis that the interaction of DisBa-01 with endothelial cell surface receptors prevents VEGF-induced proliferation, migration, invasion and adhesion to VN.

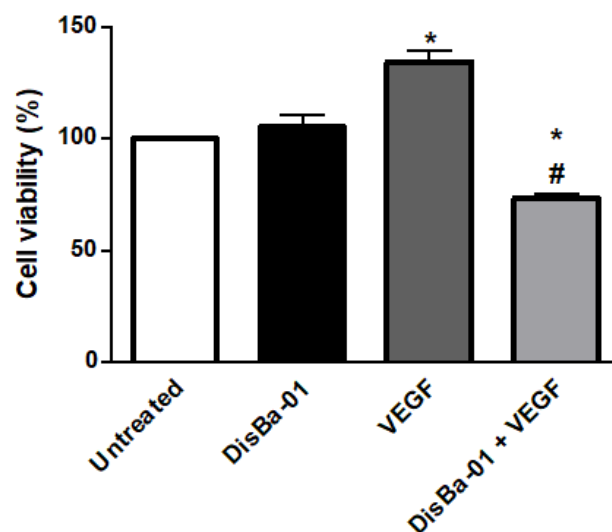


Figure 1. DisBa-01 inhibits VEGF-induced HUVEC viability. Cells were treated with DisBa-01 (1000 nM), VEGF (10 ng) or both proteins in DMEM supplemented with 0.5% FBS followed by 24h of incubation. Cell viability was measured by spectrophotometry at 540 nm (SpectraMax i3) after incubation with MTT (0.5 mg/ml). Results represent the average of three independent experiments in triplicate. Values of * $p < 0.05$ were significantly different when compared to untreated and # $p < 0.005$ when compared to VEGF group.

A

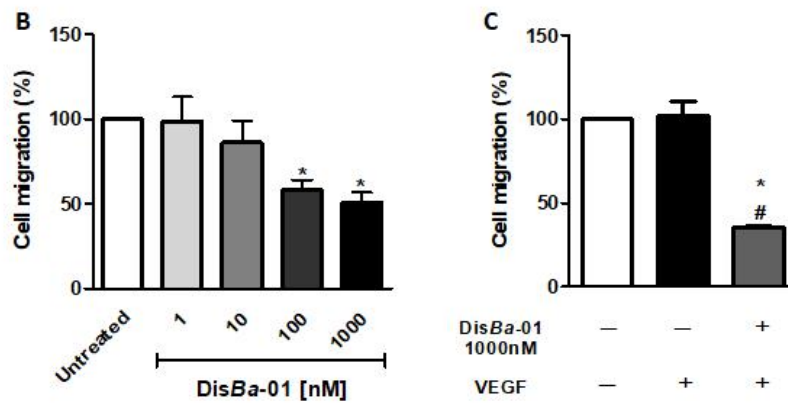
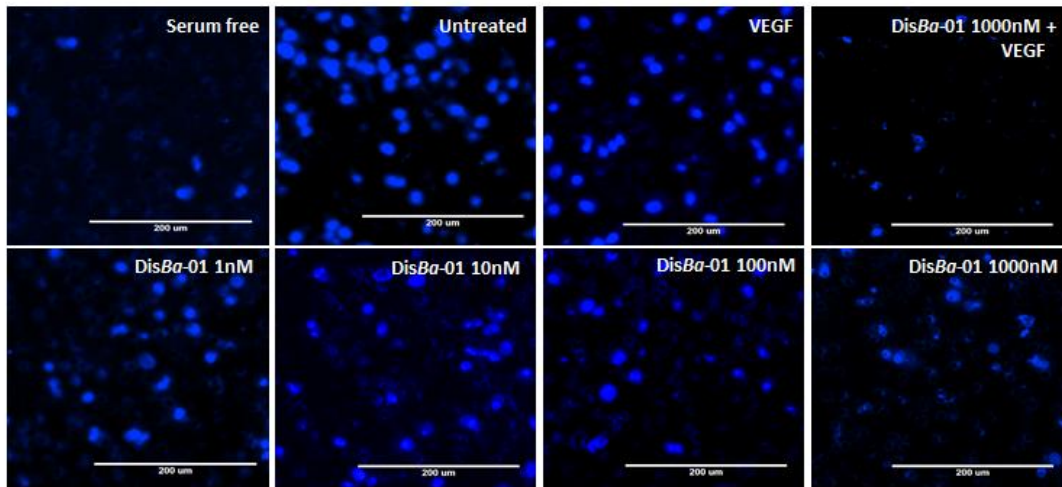


Figure 2. DisBa-01 inhibits HUVEC migration. (A) In the migration assay, HUVECs (1×10^5 cells/well) were exposed to DisBa-01 (1, 10, 100 and 1000 nM), VEGF (10 ng) or VEGF plus DisBa-01 (1000 nM) and immediately inserted into the Boyden's chamber. The chambers were immersed in 10% FBS medium and allowed to migrate for 6 h at 37 °C. Control chambers were inserted in serum-free medium. Cell nuclei were stained with DAPI (0.7 ng/ μ l) and photos (40x magnification) were obtained from a representative experiment. **(B-C)** Cell migration was measured by automated cell counting on ImageXpress microscope. The results represent the average of three independent experiments in triplicate. Values of * $p < 0.05$ were significantly different when compared to untreated and # $p < 0.05$ when compared to VEGF group.

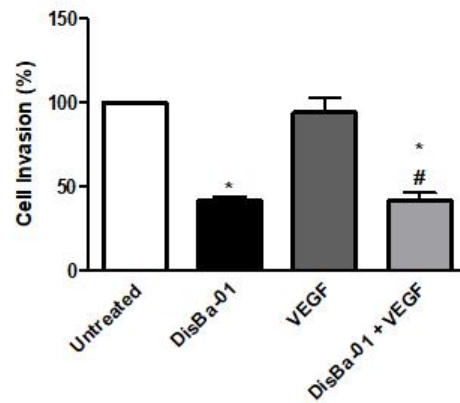
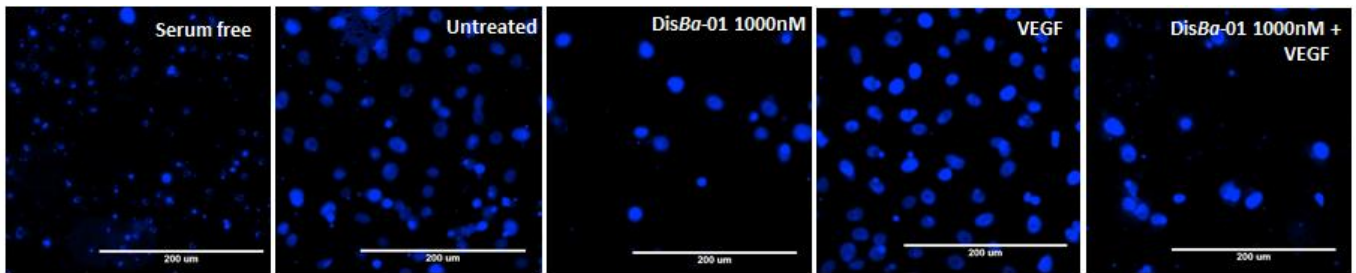


Figure 3. Invasion inhibition of DisBa-01 on HUVECs. HUVECs (2×10^5 cells/well) were treated with 1000 nM DisBa-01 and/or VEGF (10 ng) on serum-free DMEM for 30 min at 4 °C. Cells were pipetted into the Boyden's chamber and then it was inserted on well containing DMEM 10% FBS. The negative control comprised of serum-free DMEM on the wells. Invasion was allowed to occur for 18 h at 37 °C. Cell nuclei were stained with DAPI (0.7 ng/ μ l). Top panel: representative photographs of invasion assays (40x magnification). Bottom panel: quantification of invasive cells was measured by automated cell counting on ImageXpress microscope. Both results represent the average of three independent experiments in triplicate. Values of * $p < 0.05$ were significantly different when compared to untreated and # $p < 0.05$ when compared to VEGF group.

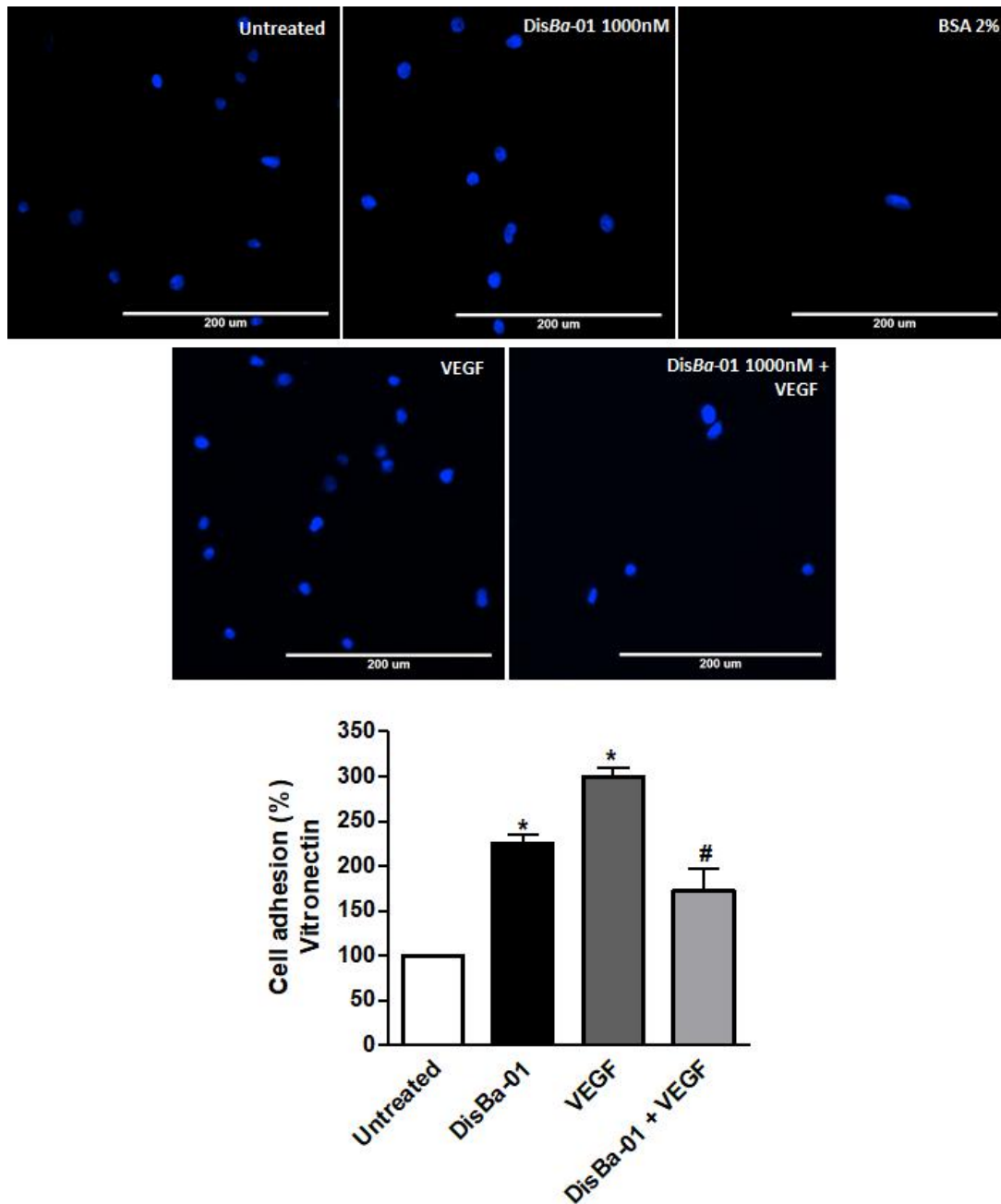


Figure 4. Effect of DisBa-01 on endothelial cell adhesion. HUVECs (1×10^5 cells/well) were treated with DisBa-01 (1000 nM) and/or VEGF (10 ng) and were immediately incubated (37 °C, 1 h) in wells precoated with vitronectin ($0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). The control comprised of wells coated with 2% BSA. Cell nuclei were stained with DAPI ($0.7 \text{ ng}/\mu\text{l}$). Top panel: representative photographs of adhesion assays (40x magnification). Bottom panel: quantification of adhesion cells was measured by automated cell counting on ImageXpress microscope. Values of * $p < 0.05$ were significantly different when compared to untreated and # $p < 0.05$ when compared to VEGF group.

3.2 DisBa-01 inhibits HUVEC tubulogenesis

The formation of tubes is a critical step in angiogenesis. After the determination that DisBa-01 inhibited cellular responses that lead to formation of a new vessel, we tested whether DisBa-01 and/or VEGF interfere on HUVEC tubulogenesis. HUVEC growth on Matrigel generated a stabilized network of capillary-like structures. This is shown by the complexity of the tubular network per field in untreated and VEGF-stimulated cells (Figure 5A).

We next tested the effects of DisBa-01 (1, 10, 100 and 1000 nM/ml) on HUVECs tubulogenesis. The generation of capillary-like tubular structures was strongly reduced when DisBa-01 (1, 100 and 1000 nM) was added during the experiments (Figure 5B and D). We also have confirmed the inhibition of VEGF-induced tubulogenesis by DisBa-01 (1000 nM/ml), specifically reducing total length (22%) (Figure 5B) and the number of tubes (80%) (Figure 5C). Distinct morphology of tubes was observed in DisBa-01-treated cells when compared to both untreated and VEGF-treated cells. Tube diameter was larger and the number of junctions and nodules has decreased.

The analysed parameters indicate that the ability of endothelial cells to form tubes has diminished in the presence of DisBa-01, thus confirming the anti-angiogenic effect of this protein.

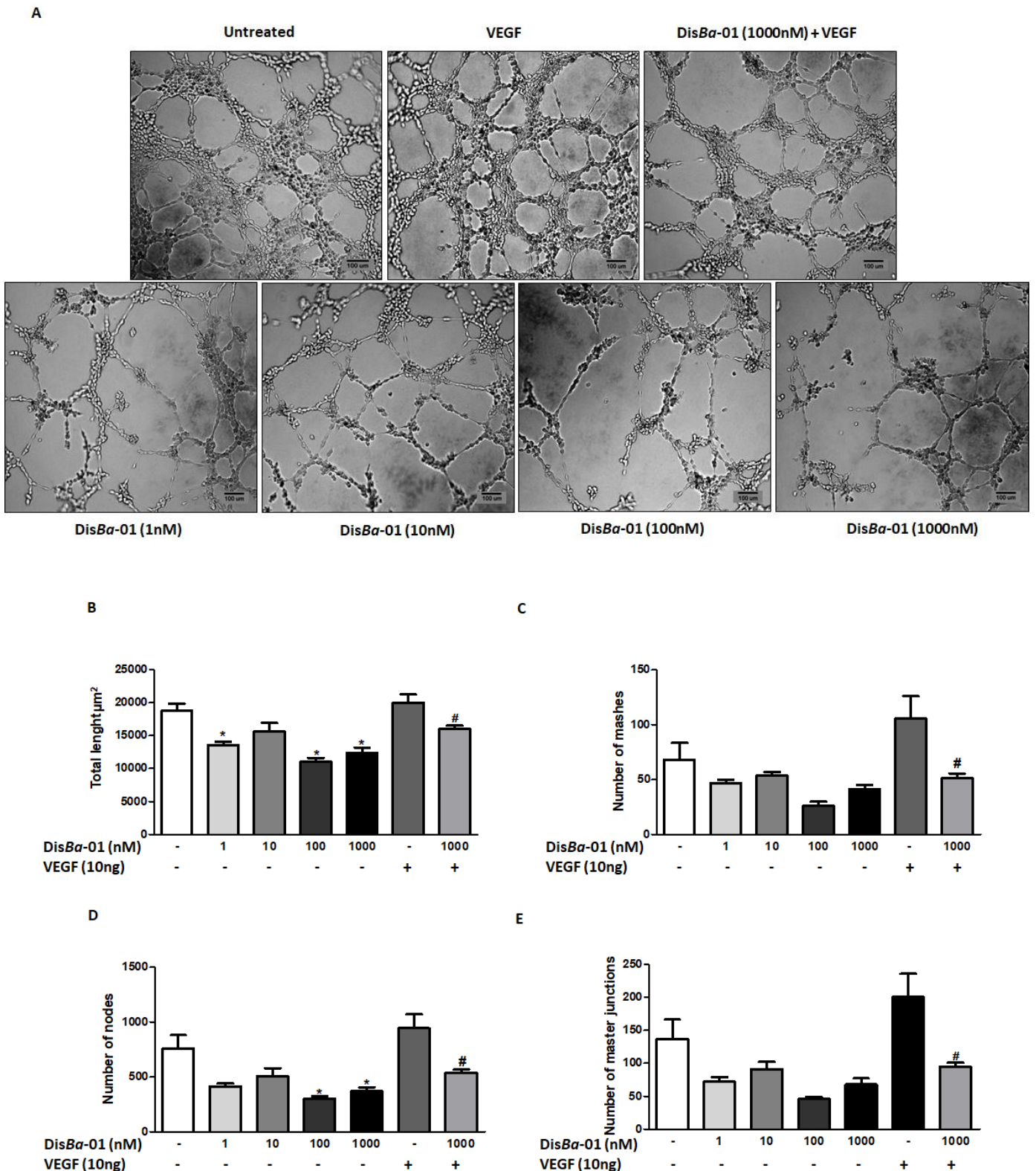


Figure 5. DisBa-01 inhibits HUVEC tubulogenesis. HUVECs (3×10^4 cells/well) were treated for 30 minutes with VEGF (10 ng), DisBa-01 (1, 10, 100 and 1000 nM) or VEGF plus DisBa-01 (1000 nM) in DMEM containing 0.5% FBS and then seeded on a solidified Matrigel. The plate was placed in a humidified CO₂ incubator at 37° C for 14 hours to allow the formation of tubes. **(A)** Photos (40x magnification) were obtained from a representative experiment. The results were expressed as the **(B)** Total length (μm^2), **(C)** Number of meshes, **(D)** Number of nodes and **(E)** Number of master junctions.

Images were photographed using the AxionVision Rel.4.8 software of a Vert.A1 microscope (Zeiss) and analyzed using the Angiogenesis Analyzer plugin for ImageJ software (version 1.51n). Both results represent the average of three independent experiments in triplicate. Values of * $p < 0.05$ were significantly different when compared to untreated and # $p < 0.05$ when compared to VEGF group.

3.3 DisBa-01 inhibits VEGFR2 expression

Endothelial cells express high amount of $\alpha_v\beta_3$ integrin during angiogenesis (BROOKS; CLARK; CHERESH, 1994), which function on the endothelium depends on β_3 cross-talk with VEGFR2 (WEST et al., 2012). DisBa-01 ability to inhibit $\alpha_v\beta_3$ response (MONTENEGRO et al., 2012, 2017; RAMOS et al., 2008) and angiogenesis are closely related to VEGFR2 signalling (BYZOVA et al., 2000b; FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003a). Due to this, we evaluated the expression of the two receptors under DisBa-01 effects in vascular endothelial human cells. DisBa-01 treatment does not affect β_3 expression as determined by flow cytometry (Figure 6A). In addition, DisBa-01 treatment did not affect mRNA levels of β_3 in both treated and untreated groups (Figure 6B).

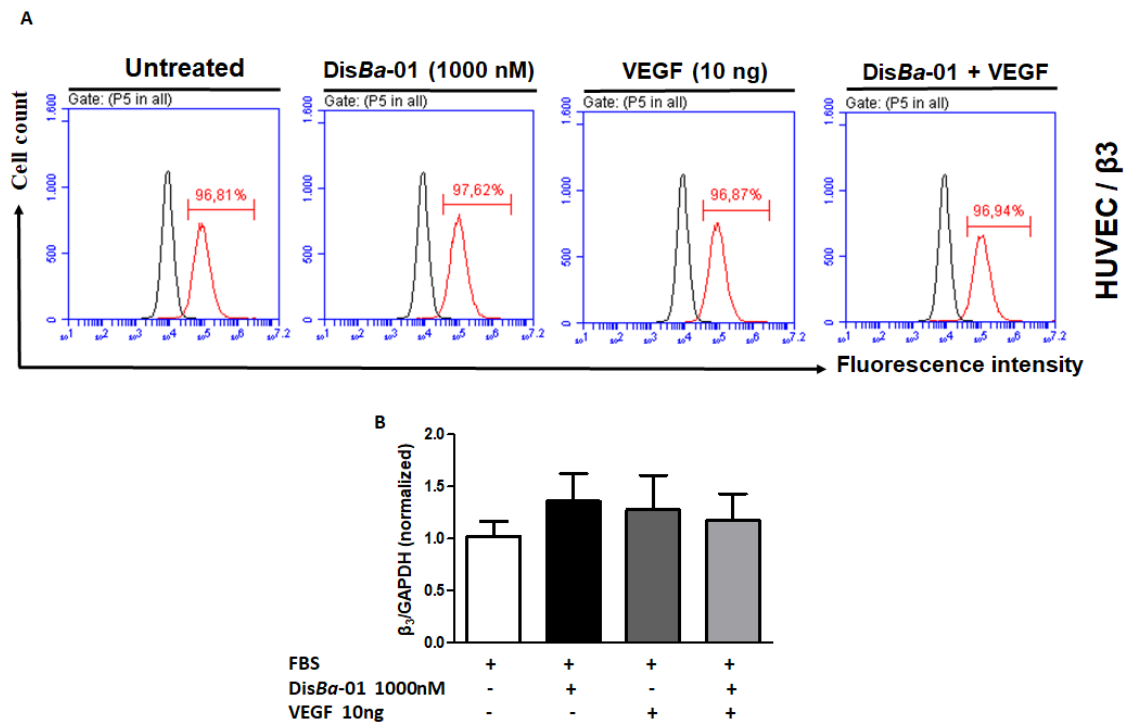
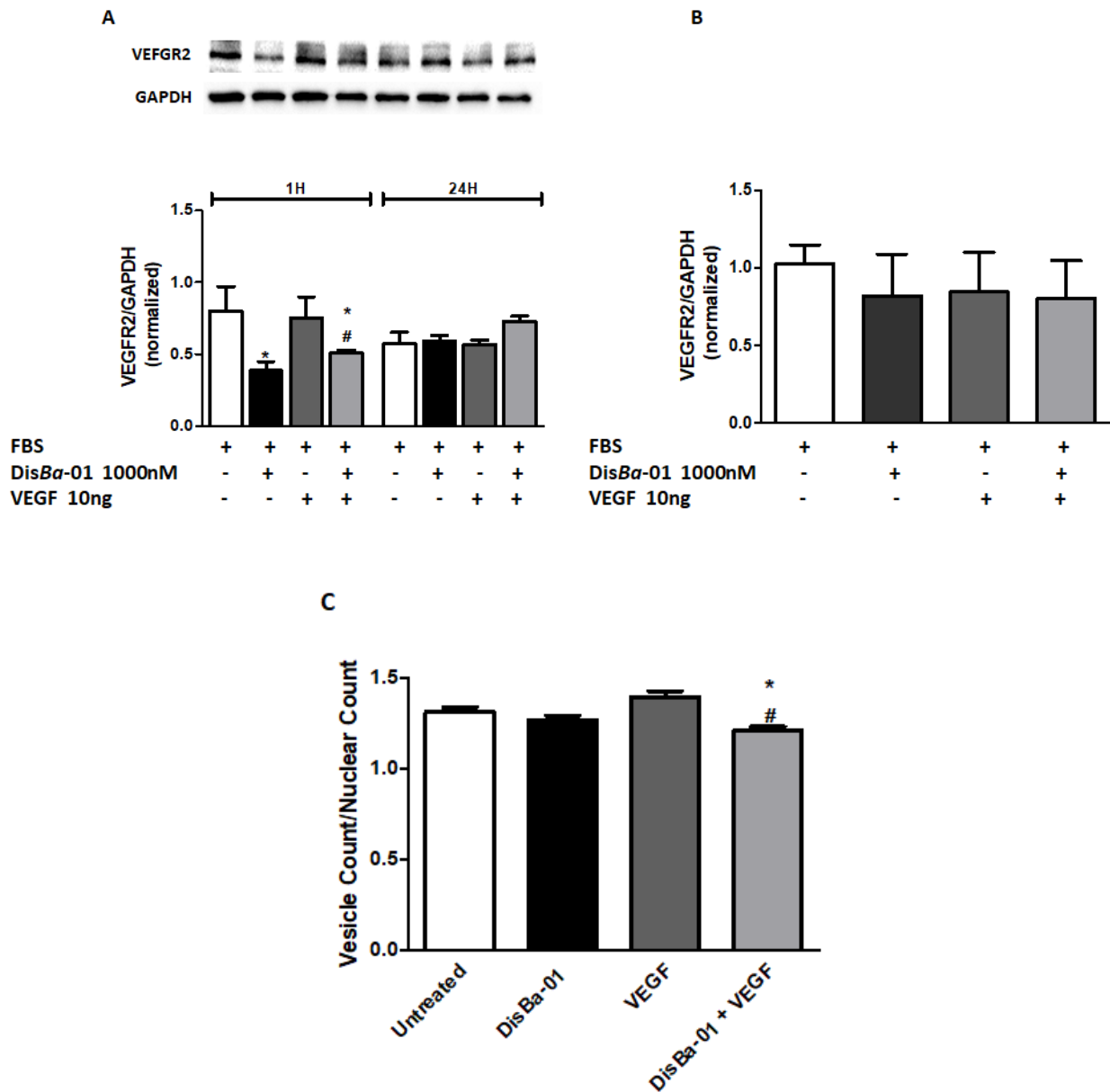


Figure 6. Expression of integrin receptors subunits under DisBa-01 treatment. (A) Expression of integrin β_3 subunit in HUVEC was analyzed in a flow cytometer. The presence of integrin receptors on the cell surface was determined with FITC dye and specific antibodies (red curve) after 1h treatment with DisBa-01 (1000 nM), VEGF (10 ng) and co-treatment (DisBa-01+VEGF). The black curve represents isotype control. **(B)** β_3 gene (ITGB3) expression. HUVECs (5×10^5 /well) were plated in 6-well plates with DMEM and 10% FBS, followed by a 24-hour starvation period on serum-free medium. Cells were then treated with DisBa-01 (1000 nM) and/or VEGF (10 ng) for 24 hours followed by lysis

and RNA isolation using TRIZOL reagent. Reverse transcription was done using *iScriptTM cDNA Synthesis* (BioRad Laboratories). qRT-PCR was carried out using specific primers to human KDR (VEGFR2) and GAPDH (housekeeping). Bar graph shows the mean \pm SE of VEGFR2 expression from three independent experiments. Values of * $p < 0.05$ were significantly different when compared to untreated and # $p < 0.05$ when compared to VEGF group.

The protein expression of VEGFR2 was analysed by western blotting. VEGF did not change the expression of its receptor. DisBa-01 down-regulated VEGFR2 expression in cell lysates after 1 h of exposure when compared with both VEGF-stimulated and untreated cells (Figure 7A). DisBa-01 treatment did not affect mRNA levels of KDR (VEGFR2) (Figure 7B) in all treated groups. Furthermore, the expression of VEGFR2 on HUVECs was confirmed by immunofluorescence (Figure 7C and D).



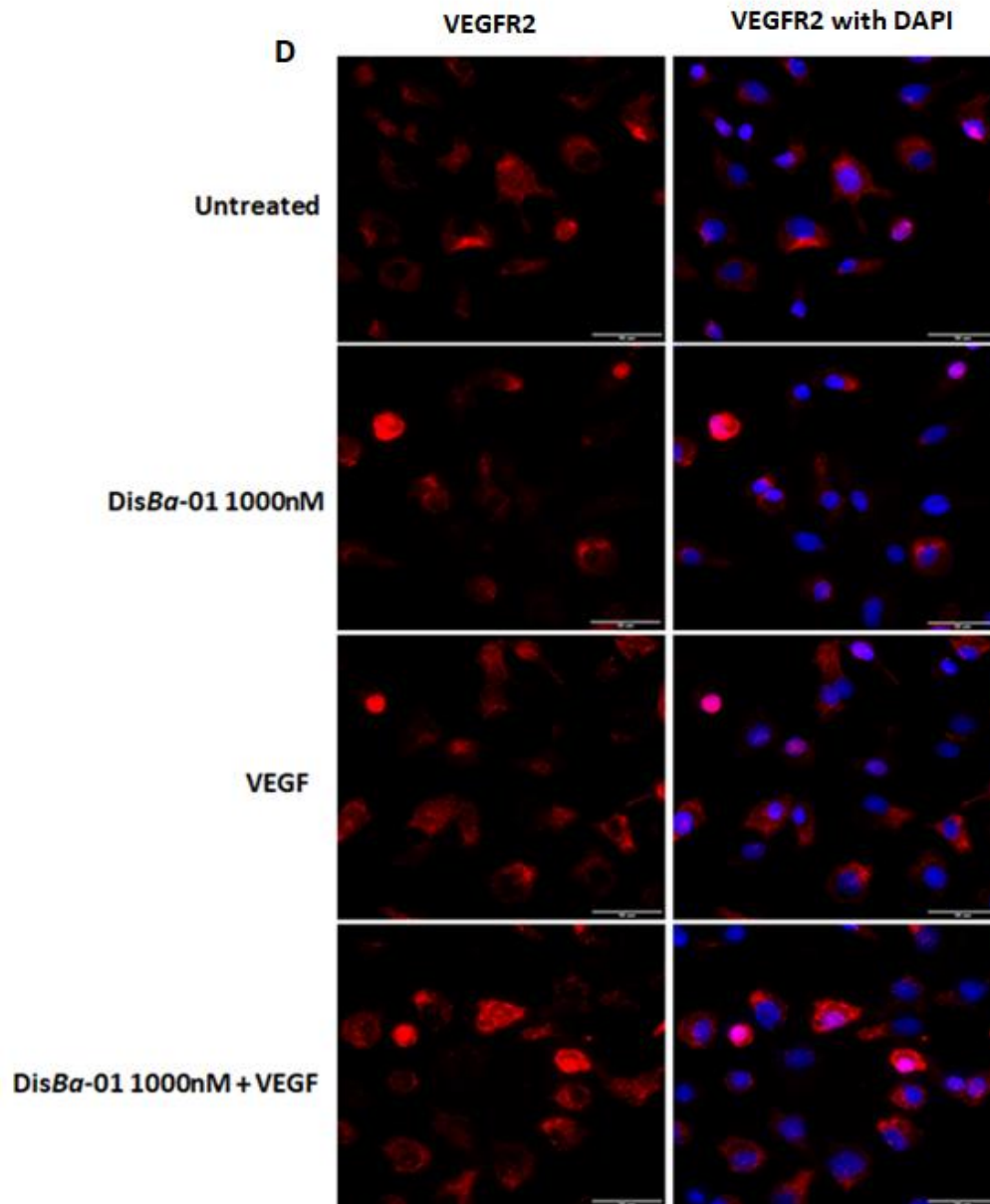


Figure 7. DisBa-01 inhibits VEGFR2 expression. (A) VEGFR2 expression by Western Blot. HUVECs (5×10^5 cells/well) were seeded in 6-well plates and left to adhere on an incubator at 37 °C, 5% CO₂, overnight, followed by a period of 24 hours of starvation at serum-free medium. Cells were treated with 1 ml of DMEM supplemented with 10% FBS and either DisBa-01 (1000 nM), VEGF (10 ng) or a co-treatment and incubated for 1 and 24 h at 37 °C, 5% CO₂, followed by cell lysis. Twenty micrograms of protein from the cell lysate were separated on SDS-PAGE. Blots were probed with VEGFR2 antibody and GAPDH antibody was used to normalize analysis. Bands corresponding to all proteins were quantified by densitometry using the ImageJ FIJI program. Bar graph shows the mean \pm SE of VEGFR2/GAPDH expression from three independent experiments. **(B)** VEGFR2 gene (KDR) expression. HUVECs (5×10^5 /well) were seeded in 6-well plates containing DMEM and 10% FBS, followed by a 24-hour starvation period on serum-free medium. Cells were treated with DisBa-01 (1000 nM) and/or VEGF (10 ng) for 24 hours followed by lysis and RNA isolation. Quantitative RT-PCR was carried out using specific primers to human KDR (VEGFR2) and GAPDH (housekeeping). **(C-D)** Immunofluorescent detection of VEGFR2. HUVECs (3×10^4 cells/well) were plated in a fibronectin-coated plate ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), in serum-free DMEM and incubated overnight at 37 °C, 5% CO₂. Cells were exposed to VEGF (10 ng), DisBa-01 (1000 nM) or VEGF plus DisBa-01 for 30 minutes in DMEM 10% FBS. Afterwards, cells were incubated with primary antibody VEGFR2 (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Abcam) and secondary antibody (Goat anti-Rabbit IgG APC 1:1000). Cell nuclei were stained with DAPI (0.7 ng/ μl). Photos (60x

magnification) were obtained from a representative experiment. Fluorescence intensity was calculated as vesicle count per nuclear count using the Transfluor Module of the MetaXpress software. Bar graph shows the mean \pm SE of VEGFR2 expression from three independent experiments. Values of * $p < 0.05$ were significantly different when compared to untreated and # $p < 0.05$ when compared to VEGF group.

3.4 DisBa-01 impaired VEGFR2 and β_3 cross-talk

The interaction between β_3 and VEGFR2 occurs in synergism. The signalling for VEGFR2 phosphorylation is originated on β_3 phosphorylation, a process initiated by VEGFR2 activation after its ligation to VEGF (MAHABELESWAR et al., 2007). We evaluated whether DisBa-01 could interfere in this cross-talk.

VEGFR2 and β_3 phosphorylation were significantly increased after VEGF stimulation in a 1 hour-treatment (Figure 8A-B). However, VEGF-induced response was inhibited by 1000 nM of DisBa-01, thus this effect was not observed on non-induced cells (Figure 8A). Likewise, as shown in Figure 8B, DisBa-01 strongly inhibited β_3 phosphorylation only in VEGF-induced cells after 1h of treatment. There were no significant differences in the expression of this integrin in a 24 hour-treatment. These data suggest that DisBa-01 impaired the cross-talk between $\alpha_v\beta_3$ and VEGFR2, which is crucial for angiogenesis regulation.

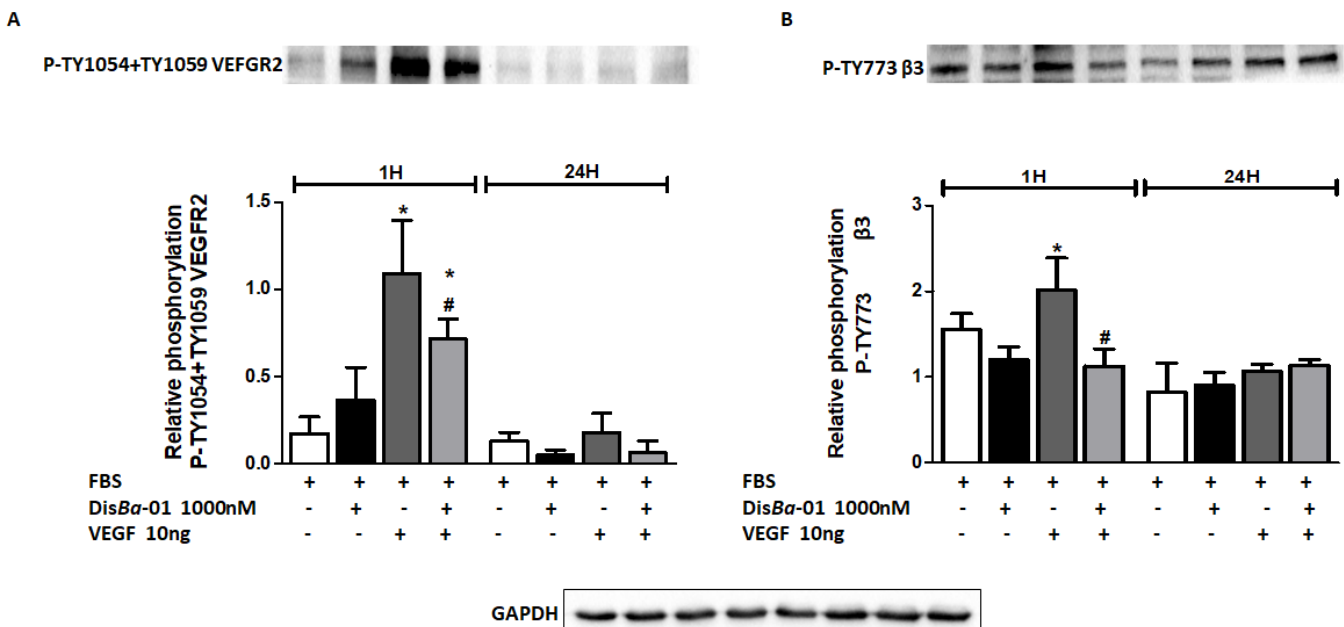


Figure 8. DisBa-01 inhibits VEGFR2 and β_3 phosphorylation after VEGF stimulation. HUVECs (5×10^5 cells/well) were seeded in 6-well plates and left to adhere at 37 °C, 5% CO₂, overnight, followed by a period of 24 hours of starvation in serum-free medium. Cells were treated with 1 ml of DMEM supplemented with 10% FBS and DisBa-01 (1000 nM), VEGF (10 ng) or a co-treatment and incubated for 1 and 24 h at 37 °C, 5% CO₂, followed by cell lysis. Twenty micrograms of protein from the cell lysates were separated on SDS-PAGE. Blots were probed with antibodies to **(A)** P-TY1054+TY1059

VEGFR2, to **(B)** P-Ty773 β_3 and GAPDH, this last to normalize loading. Bands corresponding to all proteins were quantified by densitometry using the ImageJ FIJI program. Bar graph shows the mean \pm SE of phosphorylated VEGFR2/GAPDH and β_3 /GAPDH expression from three independent experiments. Values of * $p < 0.05$ were significantly different when compared to untreated and # $p < 0.05$ when compared to VEGF group.

3.5 DisBa-01 colocalizes and correlates with $\alpha_v\beta_3$ and VEGFR2

We have investigated the colocalization of DisBa-01 with $\alpha_v\beta_3$ and VEGFR2 during cell spreading in FN. The fluorescence signal for Alexa Fluor-546 labelled DisBa-01 (red color) was detectable on the cell surface 5 min after treatment and colocalizes (Manders' Colocalization Coefficients – tM1) with $\alpha_v\beta_3$ (magenta color) and VEGFR2 (green color) (Figure 9A, B and C). In order to determine whether DisBa-01 colocalizes to VEGFR2, we have blocked integrin $\alpha_v\beta_3$ with Cilengitide, a cyclic RGD-motif pentapeptide 30 min prior to treatment. Non-significant decrease in colocalization between DisBa-01 and VEGFR2 was observed, thereby demonstrating that DisBa-01 binds to the VEGF receptor (Figure 9B and C). DisBa-01 colocalizes with both $\alpha_v\beta_3$ and VEGFR2 on HUVEC cells and correlates with each other (Pearson relation).

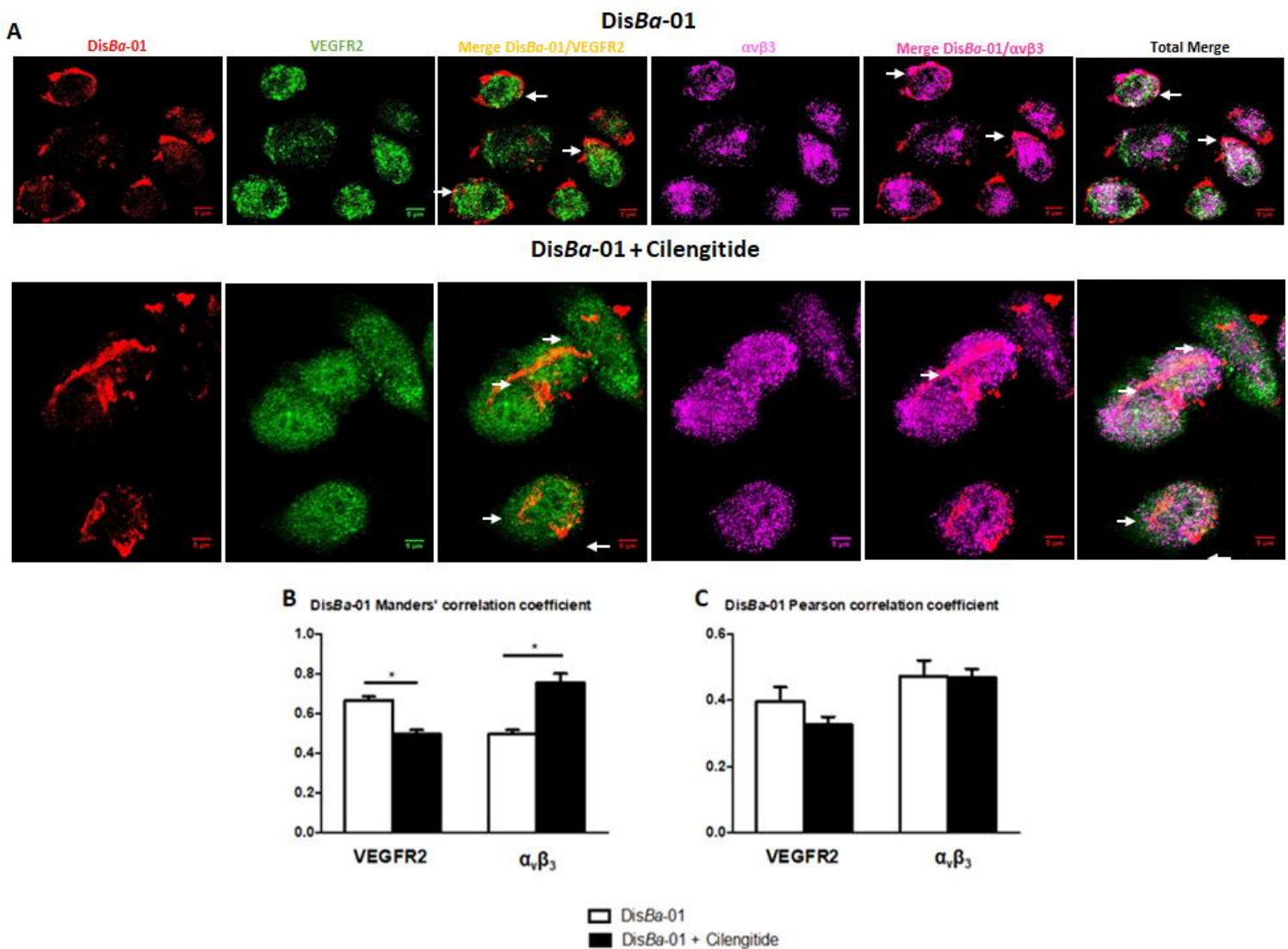


Figure 9. DisBa-01 colocalizes with VEGFR2 and $\alpha_v\beta_3$. HUVECs were plated in 8-well Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide System (Thermo Scientific), previously coated with FN (1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), at 3×10^4 cells per well in serum-supplemented DMEM and left overnight at 37 °C, 5% CO₂. Cells were treated with Cilengitide (1000 nM) for 30 min. **(A)** HUVECs were treated with 1000 nM of Alexa Fluor® 546 labelled-DisBa-01 for 2 minutes, then fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.3% Triton X-100 and double stained using specific antibodies for VEGFR2 (green color) and $\alpha_v\beta_3$ (magenta color). The signals from VEGFR2, DisBa-01 and $\alpha_v\beta_3$ were superimposed, showing sites of colocalization (tM1) between DisBa-01 and VEGFR2 in yellow and DisBa-01 with $\alpha_v\beta_3$ in pink. Slides were analyzed by confocal microscopy and pictures were taken using 63x magnification. **(B)** The tM1 fraction values (Manders' Colocalization Coefficients) show the higher co-localization amongst the two signals (near 1.0). Pearson relation shows the higher correlation among VEGFR2 and $\alpha_v\beta_3$. **(C)** Colocalization (tM1) and correlation (Pearson) between VEGFR2 and $\alpha_v\beta_3$ after treatment with Cilengitide. Results represent the average of n=10 cells. Values of *p<0.05 were significantly different when compared to untreated and #p<0.05 when compared to VEGF group.

3.6 The anti-angiogenic effect of DisBa-01 is sustained by ERK1/2 inhibition

Mechanistically, VEGF-A/VEGFR2 signalling induces angiogenesis by promoting EC proliferation, survival, migration and morphogenesis. This occurs

partially through the activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular-signal-regulated kinase-1/2 (ERK1/2) and partially through phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt signal transduction pathways (DELLINGER; BREKKEN, 2011). We have determined how *DisBa-01* affects crucial VEGFR2 signalling pathways on VEGF-induced cells.

VEGF increased ERK1/2 phosphorylation 1 h (33%) and 24 h (62%) after incubation compared with the unstimulated group. In VEGF-stimulated cells, *DisBa-01* significantly decreased ERK1/2 phosphorylation at 1 h (63.6%) and 24 h (87%) (Figure 10A). However, the phosphorylation status of PI3K was only altered by *DisBa-01* on VEGF-induced cells after 1-hour treatment (36.6% of inhibition) (Figure 10B).

The present study indicated that *DisBa-01* exerted a more pronounced effect on the suppression of ERK1/2 phosphorylation when compared to PI3K phosphorylation in HUVECs. This observation clearly illustrates that *DisBa-01*, through blockage of VEGFR2-mediated ERK1/2 signalling pathways, sustained the angiogenesis inhibition at least for 24h.

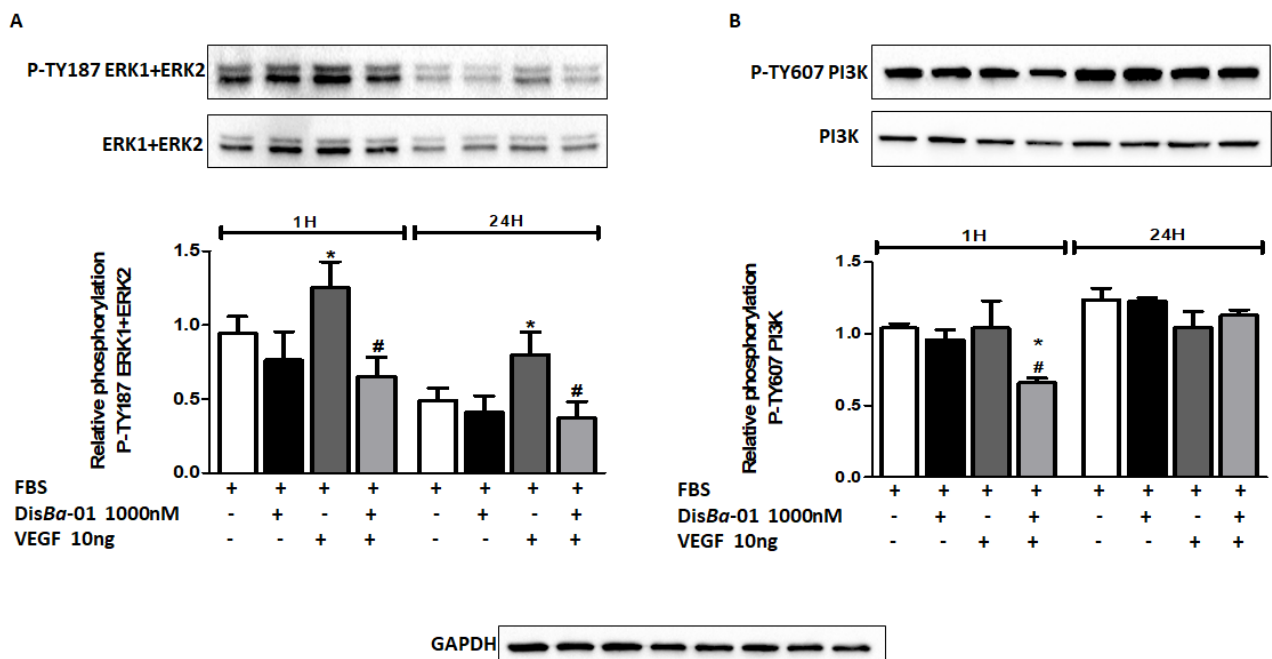


Figure 10. *DisBa-01* inhibits ERK1/2 and PI3K phosphorylation. HUVECs (5×10^5 cells/well) were seeded in 6-well plates and left to adhere at 37 °C, 5% CO₂, overnight, followed by a period of 24 hours of starvation at serum-free medium. Cells were treated with 1 ml of DMEM supplemented with 10% FBS and either *DisBa-01* (1000 nM), VEGF (10 ng) or a co-treatment and incubated for 1 and 24 h at 37 °C, 5% CO₂, followed by cell lysis. Twenty micrograms of protein from the cell lysate were separated on SDS-PAGE. Blots were probed with antibodies to **(A)** P-TY607 PI3K and anti-PI3K; to **(B)** P-TY187

ERK1+ERK2 and anti-ERK1+ERK2; and GAPDH, this last used to normalize loading. Bands corresponding to all proteins were quantified by densitometry using the ImageJ FIJI program. Bar graph shows the mean \pm SE of phosphorylated PI3K/PI3K/GAPDH and ERK1+ERK2/ERK1+ERK2/GAPDH expression from three independent experiments. Values of * $p < 0.05$ were significantly different when compared to untreated and # $p < 0.05$ when compared to VEGF group.

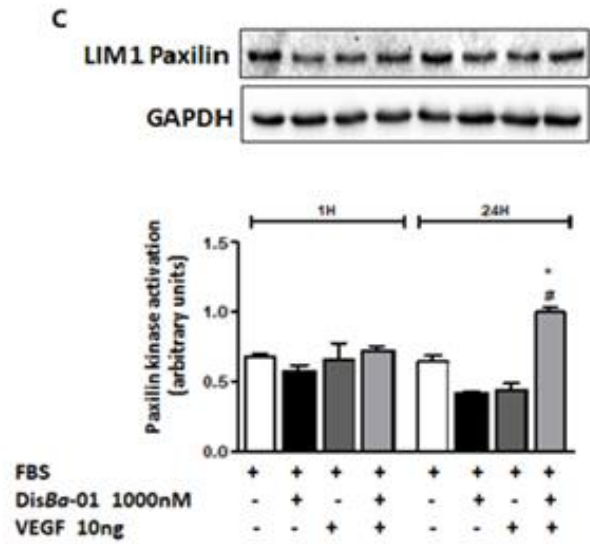
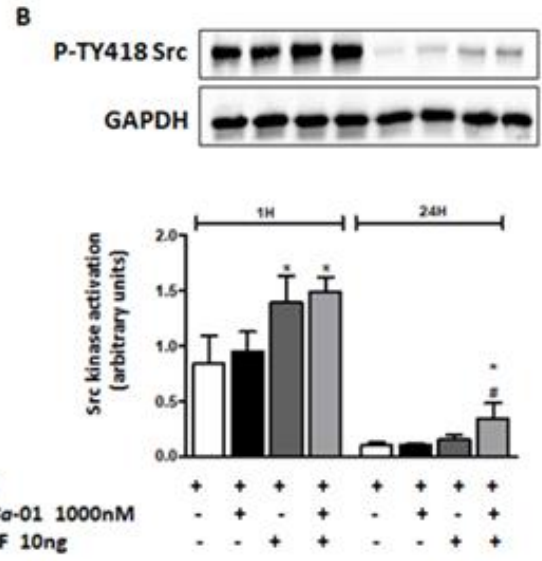
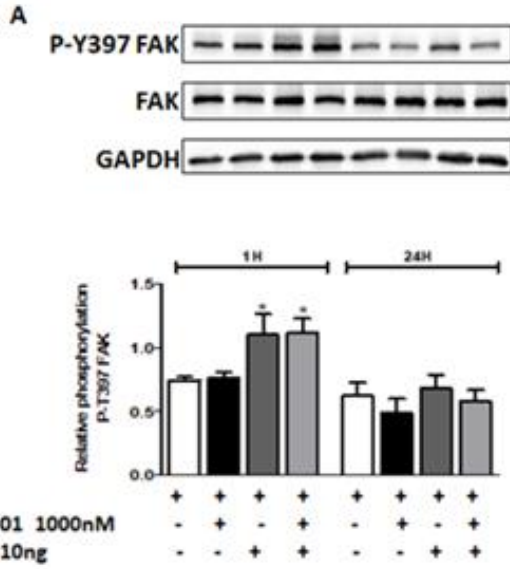
3.7 DisBa-01 changes F-actin organization in HUVECs

Endothelial cell adhesion to the ECM is mediated by integrins, whose activation promotes changes in cytoskeleton proteins through the binding of signalling molecules such as FAK. FAK is a 125-kDa cytoplasmic tyrosine kinase protein located at adhesion sites responsible for activation of cell adhesion, motility and survival responses. Most importantly, FAK is the main transducer of the integrin-mediated signalling pathway required to stabilize the actin cytoskeleton, through the creation of a kinase complex with c-SrC which uses paxillin as a major substrate (SCHALLER et al., 1992; WEINER et al., 1993).

We have observed that DisBa-01 inhibited migration and changed the morphology of tubes, leading to the questioning of whether DisBa-01 interferes with VEGF-mediated response in FAK/c-SrC/paxillin signalling. VEGF increased FAK and c-SrC phosphorylation for 1 hour but DisBa-01 did not affect this response (Figure 11A and B). Although c-SrC and Paxillin phosphorylation remained unaffected by VEGF in 24 h, the phosphorylation of both proteins was increased by DisBa-01 in VEGF-induced cells (Figure 9B-C).

In order to evaluate the morphological changes in HUVECs treated with DisBa-01 and/or VEGF, cells were stained using a fluorescent green probe to F-actin (phalloidin) in a highly selective pattern. In figure 11D, it is possible to observe that DisBa-01 causes structural changes in the actin cytoskeleton. Cells lose protrusions and acquire a circular format, and this may be related to the activation of FAK, c-SrC and Paxillin.

In summary, we have shown that DisBa-01 regulates FAK/SrC/Paxillin downstream signal, significantly affecting actin re-organization.



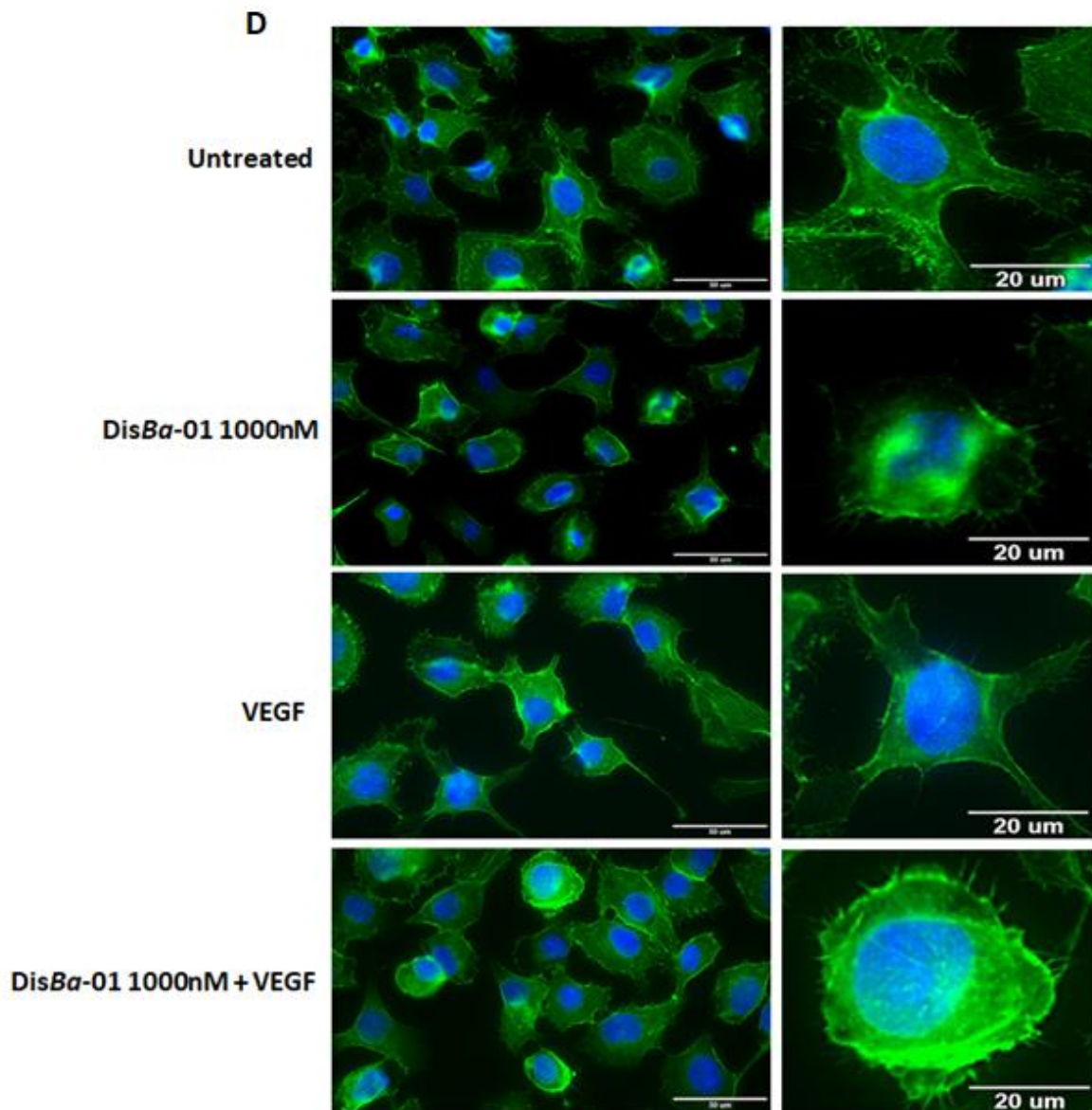


Figure 11. DisBa-01 promotes FAK, Src and Paxillin phosphorylation. HUVECs (5×10^5 cells/well) were seeded in 6-well plates and left to adhere at 37 °C, 5% CO₂, overnight, followed by a period of 24 hours of starvation at serum-free medium. Cells were treated with 1 ml of DMEM supplemented with 10% FBS and either DisBa-01 (1000 nM), VEGF (10 ng) or a co-treatment and incubated for 1 and 24 h at 37 °C, 5% CO₂, followed by cell lysis. Twenty micrograms of protein from the cell lysate were separated on SDS-PAGE. Blots were probed with antibodies to **(A)** P-Y397 FAK and anti-FAK; to **(B)** P-TY418 Src; to **(C)** phospho LIM1 Paxilin; and GAPDH, this last used to normalize loading. Bands corresponding to all proteins were quantified by densitometry using the ImageJ FIJI program. Bar graph shows the mean \pm SE of phosphorylated pFAK/FAK/GAPDH, pSrc/GAPDH and pLIM1Paxilin/GAPDH expression from three independent experiments. **(D)** Morphological changes in HUVECs treated with DisBa-01 and/or VEGF. HUVECs (3×10^4 cells/well) were plated in a 96-well Microplate previously coated with FN (1 μ g/cm²), in serum-free DMEM and incubated overnight at 37 °C, 5% CO₂. Cells were exposed to VEGF (10 ng), DisBa-01 (1000 nM) and VEGF plus DisBa-01 for 30 minutes in DMEM 10% FBS. Cell nuclei were stained with DAPI (0.7 ng/ μ l) and cytoplasm was stained with Alexa Fluor™ 488 phalloidin for 10 minutes. Images were observed using ImageXpress (Molecular Devices) equipment with 60x magnification. Values of * $p < 0.05$ were significantly different when compared to untreated and # $p < 0.05$ when compared to VEGF group.

4. Discussion

Tumors exhibit considerable variation in the pattern and properties of angiogenic blood vessels, as well as in their responses to anti-angiogenic therapy. The angiogenic programming is a multidimensional process regulated by tumor cells in conjunction with a variety of tumor associated stromal cells such as cancer associated fibroblasts (*CAFs*) and tumor-associated macrophages (*TAMs*), and their bioactive products, which encompass cytokines, growth factors, extracellular matrix and their ligands (DE et al., 2005; KERBEL, 2008).

Tumor angiogenesis is predominantly driven by VEGF and its receptor, VEGFR2. VEGF signaling pathway inhibitors may prolong the average survival of patients with colorectal, lung and breast cancers in combination with chemotherapy and renal cancer when used as monotherapy. However, there is a negative barrier related to acquired resistance to anti-angiogenic therapy (PAPO et al., 2011; RAMJAWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017). Angiogenesis is also regulated by endothelial cell adhesion molecules, such as $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrins. Inhibitors of these integrins suppress tumor growth in some preclinical models but did not produce significant results in most experimental tests (ROCHA et al., 2017; WEIS; CHERESH, 2011).

The cross-talk between VEGFR2 and $\alpha_v\beta_3$ is crucial for several cellular functions. In endothelial cells, the interaction between $\alpha_v\beta_3$ and VEGFR2 is a particularly important process during vascularization. The mutual relationship between VEGFR2 and $\alpha_v\beta_3$ regulates various cellular activities involved in tumor angiogenesis, including maximal transduction of angiogenic growth factors, migration and survival of endothelial cells, and tubes formation (MAHABELESWAR et al., 2007; ROSS, 2004; SOMANATH; MALININ; BYZOVA, 2009a). Disabling these interactions by compromising both components, $\alpha_v\beta_3$ and VEGFR2, could improve the effectiveness of current anti-angiogenic strategies and could potentially block one of the mechanisms that contributes to therapy resistance.

Here we present evidence on the potent anti-angiogenic mechanism of DisBa-01, an RGD-disintegrin and $\alpha_v\beta_3$ inhibitor, which has been previously described (CASSINI-VIEIRA et al., 2014; MONTENEGRO et al., 2012), although its mechanism

of action was not proved. The data presented in this study support for the first time an additional mechanism for DisBa-01 directing an anti-angiogenic effect on endothelial cells.

DisBa-01 inhibits VEGF-mediated angiogenesis by impairing $\alpha_v\beta_3$ /VEGFR2 cross-talk. DisBa-01 was able to inhibit the angiogenic cascade steps induced by VEGF, which includes proliferation, migration, invasion, adhesion and tubes formation. As demonstrated by previous studies, RGD disintegrins, such as triflavin, accutin, salmosin, rhodostomin and contortrostatin, have similar anti-proliferative, anti-migratory, anti-adhesive and anti-angiogenic effects mediated or not by growth factors in endothelial cells (KANG; LEE; KIM, 1999b; SHEU et al., 1997; SWENSON et al., 2006; YEH et al., 2001; YEH; PENG; HUANG, 1998). However, none of these studies showed the occurrence of a synergistic inhibition between VEGFR2 and $\alpha_v\beta_3$ by these RGD-disintegrins.

Further evidence in this field of study was achieved from other integrin inhibitors such as Cilengitide, a RGD-cyclic peptide with nanomolar inhibitory activity to $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrins. Cilengitide has been tested in patients with various advanced solid tumors and its eminent inhibitory activity was previously reported (CHINOT, 2014; HADDAD et al., 2017). However, after 10 years of clinical trials with cilengitide, the results are still not favorable. The reasons for the lack of success may be related to the dose discrepancy, in which only high doses of this peptide have anti-angiogenic effects (CHINOT, 2014; HADDAD et al., 2017). Besides, and in contrast to DisBa-01, low concentrations (nanomolar scale) of cilengitide promote VEGF mediated angiogenesis by altering $\alpha_v\beta_3$ integrin and VEGFR2 trafficking, thereby promoting endothelial cell migration and pro-angiogenic effects, compromising its efficacy as an anticancer agent (REYNOLDS et al., 2009).

Regarding to DisBa-01, a possible mechanism of action for the impairment of VEGFR2/ $\alpha_v\beta_3$ cross-talk by this disintegrin is the modulation of expression and phosphorylation status of VEGFR2 and $\alpha_v\beta_3$ integrin. VEGF stimulated endothelial cells, promotes VEGFR2 phosphorylation, and internalized VEGFR2 accumulation of in endosomes and lysosomes (EWAN et al., 2006; LAMPUGNANI et al., 2006). DisBa-01 was able to attenuate the protein expression of VEGFR2 without affecting β_3 integrin content. These results may suggest that DisBa-01 impairs the accumulation and the

recycling of internalized VEGFR2, but it does not inhibit $\alpha_v\beta_3$ recycling, leading to a reduction on the cellular responses to VEGF. On the other hand, cilengitide and S 36578, another $\alpha_v\beta_3$ antagonist, promote the rapid recycling of internalized VEGFR2 and prevent VEGFR2 degradation, shuttling VEGFR2 back to the plasma membrane, thus amplifying the cellular response to VEGF (REYNOLDS et al., 2009). Here we also show that DisBa-01 did not affect VEGFR2 and $\alpha_v\beta_3$ mRNA levels, suggesting that its effects on VEGFR2 and $\alpha_v\beta_3$ expression occur at a post-transcriptional level (REYNOLDS et al., 2009).

It is known that tyrosine phosphorylation within the β_3 integrin subunit occurs in response to VEGF and it is essential for VEGFR2- β_3 association, VEGFR2 activation and subsequent signaling. Thus, the cross-talk between the two receptors determines the cellular responses to VEGF, as well as the binding of the integrin, which is regulated by tyrosine phosphorylation events (BYZOVA et al., 2000b; MAHABELESHWAR et al., 2007; SOMANATH; MALININ; BYZOVA, 2009b). Antibody blockade of the $\alpha_v\beta_3$ function inhibits VEGFR2 phosphorylation, indicating that this phosphorylation is $\alpha_v\beta_3$ dependent. Similarly, VEGFR2 inhibitors impair the formation of complexes between VEGFR2 and β_3 subunit (BYZOVA et al., 2000b; MAHABELESHWAR et al., 2007; SOMANATH; MALININ; BYZOVA, 2009b). This study showed that DisBa-01 inhibits β_3 phosphorylation by impairing VEGFR2 phosphorylation in a dependent pathway. Previously, we observed that this disintegrin has a high affinity with $\alpha_v\beta_3$ (MONTENEGRO et al., 2017; RAMOS et al., 2008) and colocalizes with VEGFR2, also being able to phosphorylate these two receptors, demonstrating its importance in modulating the VEGFR2/ $\alpha_v\beta_3$ cross-talk in both ways.

Phosphorylation of β_3 integrin subunit modulates several intracellular events, including VAV-1/Rho GTPase activation, actin cytoskeleton reorganization and regulation of the ERK1/2 and PI3K pathways, which are involved in the modulation of basic cellular functions such as cell spreading and survival (SPIERING; HODGSON, 2011). Additionally, it must be noted that the above-mentioned set of signaling kinases (ERK1/2 and PI3K) are also modulated via VEGFR2 activation by VEGF on HUVECs (DELLINGER; BREKKEN, 2011; MAVRIA et al., 2006; ZACHARY, 2003). Our study demonstrated that DisBa-01 inhibits VEGF-dependent phosphorylation of ERK 1/2 and PI3K, supporting the inhibition of proliferation, migration and invasion via ERK 1/2

dephosphorylation. After a 24-hour treatment, phosphorylated PI3K levels returned to baseline with a small increase after stimulation with VEGF. Sustained endothelial activation of PI3K has been shown to induce the formation of structurally abnormal blood vessels that resembling the aberrations of tumor vessels (DELLINGER; BREKKEN, 2011; KARAR; MAITY, 2011), corroborating the morphological changes caused by DisBa-01 during tubulogenesis.

Erk1 and Erk2 deletions in primary endothelial cells resulted in decreased cell proliferation and migration, impaired apoptosis and interestingly, leading to alterations on both Paxillin and FAK expression, promoting defects in the cytoskeleton organization, thus impairing cell motility (SRINIVASAN et al., 2009). The morphological changes are followed by loss of intercellular contacts and disorganization of cellular cytoskeleton. In fact, the inhibition of integrin-dependent activation of FAK, Src and Paxillin in HUVECs have been demonstrated by signaling experiments (PROVENZANO; KEELY, 2011). The importance of FAK as an antitumor endothelial target has been enhanced by the observation that its inhibition on endothelial cells prevented tumor metastasis, improving the function of the endothelial barrier (JEAN et al., 2014). In the present study, DisBa-01 affected FAK phosphorylation. Activated FAK exhibits phospho-tyrosine anchor sites for several classes of signaling molecules, including those belonging to the PI3K/Akt signaling pathway (SOMANATH; MALININ; BYZOVA, 2009a) and Src (ELICEIRI; CHERESH, 1999; SENGER et al., 1996), which are involved in various cellular functions. Src is the major tyrosine kinase associated with β_3 following stimulation of cells with growth factors and it is the possible kinase responsible for phosphorylation of β_3 cytoplasmic tyrosines, a pathway that controls the functional association between $\alpha_v\beta_3$ and VEGFR2, which, in turn, regulates activation of both receptors on ECs. This functional interplay is crucial for EC adhesion, migration and start of the angiogenic programming in ECs (WEST et al., 2012; WESTHOFF et al., 2004). Src activation by DisBa-01, however, appears to be insufficient to fully activate downstream signaling pathways, such as ERK1/2 or PI3K and unaltered β_3 phosphorylation probably due to the lack of additional adaptors and signaling proteins regularly present at focal adhesions. Another disintegrin, Kistrin, which selectively binds to $\alpha_v\beta_3$, inhibits FAK/Src association and decreases the response to VEGF (HELAL-NETO et al., 2016).

Paxillin is a signal transduction adapter protein, which is associated with focal adhesions, being one of the main substrates of FAK. It has been reported that VEGF-A recruits FAK, which phosphorylates Paxillin in ECs (YANG et al., 2014). This phosphorylation promotes the development of the Paxillin-Crk-Dock180 molecular complex that regulates the activity of guanine-Rho triphosphatase and activates Rac in addition to extracellular signaling pathways regulated by kinase signals (ERK and Src), leading to cell migration and adhesion (YANG et al., 2014). Although FAK and Src phosphorylation improved by DisBa-01 was able to activate Paxillin, this activation was not enough to stimulate the ERK pathway. Despite this result, Paxillin activation mediated by DisBa-01 can possibly cooperated with the morphological differences observed in this study, besides contributing with the migration inhibition.

The data above corroborate Montenegro et al (MONTENEGRO et al., 2017), in which oral squamous cancer cells (OSCC), treated with DisBa-01, showed an increase in Paxillin immunostaining, justifying the presence of higher focal and maturity adhesions and a decrease in directionality and speed during cell migration.

Taken together, DisBa-01 impairs the β_3 /VEGFR2 cross-talk in HUVECs, which interferes in the signaling pathways of ERK1/2, PI3K, FAK, Src and Paxillin, resulting in anti-angiogenic action and cellular morphological alterations.

Funding: This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo [FAPESP, 2013/00798-2] and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors declare no competing financial interests.

Contribution

Conceived and designed the experiments: Heloisa Sobreiro Selistre-de-Araujo and Taís Marolato Danilucci. Performed the experiments: Taís Marolato Danilucci, Patty K. Santos, Bianca C. Pachane, Graziéle F. D. Pisani, Rafael Bressani Lino and Bruna Carla Casali. Analyzed the data: Taís Marolato Danilucci. Contributed reagents/materials/analysis tools: Heloisa Sobreiro Selistre-de-Araujo. Wrote the

paper: Taís Marolato Danilucci, Bianca C. Pachane, Patty K. Santos, Graziéle F. D. Pisani and Heloisa Sobreiro Selistre-de-Araujo.

References

ABHINAND, C. S. et al. VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v.10, n.4, p. 347-354, 2016.

ALGHISI, G. C.; PONSONNET, L.; RÜEGG, C. The integrin antagonist cilengitide activates $\alpha\beta_3$, disrupts VE-cadherin localization at cell junctions and enhances permeability in endothelial cells. **PLoS ONE**, v. 4, n. 2, p. e4449, 2009.

BRAKENHIELM, E. Substrate matters: Reciprocally stimulatory integrin and VEGF signaling in endothelial cells. **Circulation Research**, v. 101, n. 6, p. 536–538, 2007.

BROOKS, P. C.; CLARK, R. A; CHERESH, D. A. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. **Science**, v. 264, n. 1990, p. 569–571, 1994.

BYZOVA, T. V et al. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. **Molecular Cell**, v. 6, n. 4, p. 851–60, 2000.

CALVETE, J. J. et al. The presence of the WGD motif in CC8 heterodimeric disintegrin increases its inhibitory effect on $\alpha\text{IIb}\beta_3$, $\alpha\beta_3$, and $\alpha_5\beta_1$ integrins. **Biochemistry**, v. 41, n. 6, p. 2014–2021, 2002.

CASSINI-VIEIRA, P. et al. DisBa-01 inhibits angiogenesis, inflammation and fibrogenesis of sponge-induced-fibrovascular tissue in mice. **Toxicol**, v. 15, n. 92, p. 81–89, 2014.

CHINOT, O. L. Cilengitide in glioblastoma: When did it fail?. **The Lancet Oncology**, v.15, n.10, p. 1044-45, 2014.

COMOGLIO, P. M.; BOCCACCIO, C.; TRUSOLINO, L. Interactions between growth factor receptors and adhesion molecules: Breaking the rules. **Current Opinion in Cell Biology**, v.15, n. 5, p. 565-71, 2003.

DE, S. et al. VEGF-integrin interplay controls tumor growth and vascularization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 21, p. 7589–94, 2005.

DELLINGER, M. T.; BREKKEN, R. A. Phosphorylation of Akt and ERK1/2 is required for VEGF-A/VEGFR2-induced proliferation and migration of lymphatic endothelium. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. e28947, 2011.

ELICEIRI, B. P.; CHERESH, D. A. The role of α_v integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 9, p. 1227–12330, 1999.

EWAN, L. C. et al. Intrinsic tyrosine kinase activity is required for vascular endothelial growth factor receptor 2 ubiquitination, sorting and degradation in endothelial cells. **Traffic**, v. 7, n. 9, p. 1270–1282, 2006.

FELDING-HABERMANN, B. et al. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United**

States of America, v. 98, n. 4, p. 1853–1858, 2001.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 669–676, 2003.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nature medicine**, v. 1, n. 1, p. 27–31, 1995.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? **Nature reviews: Drug discovery**, v. 6, n. 4, p. 273–86, 2007.

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

HELAL-NETO, E. et al. Priming Endothelial Cells With a Melanoma-Derived Extracellular Matrix Triggers the Activation of $\alpha\beta 3$ /VEGFR2 Axis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 231, n. 11, p. 2464–2473, 2016.

HYNES, R. O. Integrins: A family of cell surface receptors. **Cell**, v. 46, n.4, p.549-54, 1987.

HYNES, R. O. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. **Nature Medicine**, v. 8, n. 9, p. 918–921, 2002.

JEAN, C. et al. Inhibition of endothelial FAK activity prevents tumor metastasis by enhancing barrier function. **Journal of Cell Biology**, v. 204, n. 2, p. 247–263, 2014.

KANG, I. C.; LEE, Y. D.; KIM, D. S. A novel disintegrin salmosin inhibits tumor angiogenesis. **Cancer Research**, v. 59, n. 15, p. 3754–3760, 1999a.

KANG, I. C.; LEE, Y. D.; KIM, D. S. A novel disintegrin salmosin inhibits tumor angiogenesis. **Cancer Research**, v. 59, n. 15, p. 3754–3760, 1999.

KARAR, J.; MAITY, A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 1-8, 2011.

KAUSKOT, A. et al. Hemostatic effects of recombinant DisBa-01, a disintegrin from *Bothrops alternatus*. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, n. 13, p. 6604–6616, 2008.

KERBEL, R. Tumor Angiogenesis. **The New England journal of medicine**, v. 358, n. 19, p. 2039–2049, 2008.

LAMPUGNANI, M. G. et al. Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. **Journal of Cell Biology**, v. 174, n. 4, p. 593–604, 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

MAHABELESHWAR, G. H. et al. Mechanisms of integrin-vascular endothelial growth factor receptor cross-activation in angiogenesis. **Circulation Research**, v. 101, n. 6, p. 570–580, 2007.

MAHABELESHWAR, G. H. et al. Integrin affinity modulation in angiogenesis. **Cell Cycle**, v. 7, n. 3, p. 335–347, 2008.

MAVRIA, G. et al. ERK-MAPK signaling opposes Rho-kinase to promote endothelial

- cell survival and sprouting during angiogenesis. **Cancer Cell**, v. 9, n. 1, p. 33–44, 2006.
- MONTENEGRO, C. F. et al. Blocking $\alpha\beta_3$ integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. **Biochimie**, v. 94, n. 8, p. 1812–1820, 2012.
- MONTENEGRO, C. F. et al. Inhibition of $\alpha\beta_3$ integrin induces loss of cell directionality of Oral Squamous Carcinoma Cells (OSCC). **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0176226, 2017.
- NIEWIAROWSKI, S. et al. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Seminars in hematology**, v. 31, n. 4, p. 289–300, 1994.
- OLSSON, A.-K. et al. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. **Nature Reviews: Molecular cell biology**, v. 7, n. 5, p. 359–371, 2006.
- PAPO, N. et al. Antagonistic VEGF variants engineered to simultaneously bind to and inhibit VEGFR2 and $\alpha\beta_3$ integrin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 34, p. 14067–14072, 2011.
- PROVENZANO, P. P.; KEELY, P. J. Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and Rho GTPase signaling. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 8, p. 1195–1205, 2011.
- RAMJIAWAN, R. R.; GRIFFIOEN, A. W.; DUDA, D. G. Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy? **Angiogenesis**, v. 20, n. 2, p. 185-204, 2017.
- RAMOS, O. H. P. et al. A novel $\alpha\beta_3$ -blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 25, n. 1, p. 53–64, 2008.
- REYNOLDS, A. R. et al. Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors. **Nature Medicine**, v. 15, n. 4, p. 392–400, 2009.
- ROCHA, L. A. et al. $\alpha\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrin-specific ligands: From tumor angiogenesis inhibitors to vascularization promoters in regenerative medicine? **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 1, p. 208-227, 2017.
- ROSS, R. S. Molecular and mechanical synergy: Cross-talk between integrins and growth factor receptors. **Cardiovascular Research**, v. 63, n. 3, p. 381-90, 2004.
- SCHALLER, M. D. et al. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 11, p. 5192–6, 1992.
- SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. et al. **Snake venom disintegrins and cell migration. Toxins**, v. 2, n. 11, p. 2606-21, 2010.
- SENGER, D. R. et al. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the $\alpha\beta_3$ integrin, osteopontin, and thrombin. **The American Journal of pathology**, v. 149, n. 1, p. 293–305, 1996.
- 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- $\alpha(v)\beta_3$ integrin monoclonal antibody. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1336, n. 3, p. 445–

454, 1997.

SMITH, G. A. et al. The cellular response to vascular endothelial growth factors requires co-ordinated signal transduction, trafficking and proteolysis. **Bioscience Reports**, v. 35, n. 5, p. 1–15, 2015.

SOLDI, R. et al. Role of α v β 3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 4, p. 882–92, 1999.

SOMANATH, P. R.; MALININ, N. L.; BYZOVA, T. V. Cooperation between integrin α v β 3 and VEGFR2 in angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 12, n. 2, p. 177–85, 2009.

SPIERING, D.; HODGSON, L. Dynamics of the rho-family small GTPases in actin regulation and motility. **Cell Adhesion and Migration**, v. 5, n. 2, p. 170–180, 2011.

SRINIVASAN, R. et al. Erk1 and erk2 regulate endothelial cell proliferation and migration during mouse embryonic angiogenesis. **PLoS ONE**, v. 4, n. 12, p. e8283, 2009.

SWENSON, S. et al. Contortrostatin, a snake venom disintegrin with anti-angiogenic and anti-tumor activity. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 34, n. 4–5, p. 169–176, 2006.

SWENSON, S.; ERNST, W.; MARKLAND, F. S. Contortrostatin, a Snake Venom Disintegrin with Anti-Angiogenic and Anti-Tumor Activity. **Pathophysiology Haemostasis Thrombosis**, v. 34, n. 5, p. 169–176, 2005.

TOME, Y. et al. The disintegrin echistatin in combination with doxorubicin targets high-metastatic human osteosarcoma overexpressing α v β 3 integrin in chick embryo and nude mouse models. **Oncotarget**, v. 7, n. 52, p. 87031–87036, 2016.

WEINER, T. M. et al. Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. **Lancet**, v. 342, n. 8878, p.1024-1025, 1993.

WEIS, S. M.; CHERESH, D. A. α v integrins in angiogenesis and cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, p. a006478, 2011.

WEST, X. Z. et al. Integrin β 3 crosstalk with VEGFR accommodating tyrosine phosphorylation as a regulatory switch. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31071, 2012.

WESTHOFF, M. A. et al. Src-Mediated Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase Couples Actin and Adhesion Dynamics to Survival Signaling Src-Mediated Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase Couples Actin and Adhesion Dynamics to Survival Signaling. **Molecular Cell Biology**, v. 24, n. 18, p. 8113–8133, 2004.

YANG, W. et al. Paxillin regulates vascular endothelial growth factor A-induced in vitro angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 3, p. 1784–1792, 2014.

YEH, C. H. et al. Rhodostomin, a snake venom disintegrin, inhibits angiogenesis elicited by basic fibroblast growth factor and suppresses tumor growth by a selective α (v) β (3) blockade of endothelial cells. **Molecular Pharmacology**, v. 59, n. 5, p. 1333–1342, 2001.

YEH, C. H.; PENG, H. C.; HUANG, T. F. Accutin, a new disintegrin, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo by acting as integrin α v β 3 antagonist and inducing apoptosis. **Blood**, v. 92, n. 9, p. 3268–76, 1998.

ZACHARY, I. VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, n. Pt 6, p. 1171–7, 2003.

ZAKRAOUI, O. et al. Lebein, a snake venom disintegrin, suppresses human colon cancer cells proliferation and tumor-induced angiogenesis through cell cycle arrest, apoptosis induction and inhibition of VEGF expression. **Molecular Carcinogenesis**, v. 56, n. 1, p. 18–35, 2017.

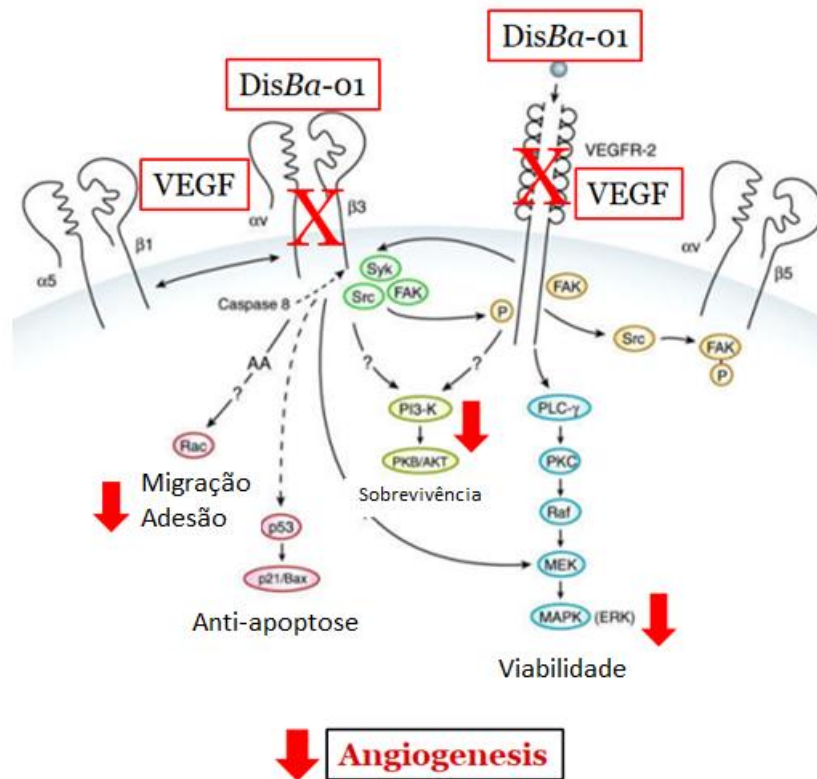
7. Conclusão

Considerando o potencial terapêutico da DisBa-01 na inibição da angiogênese e o desconhecimento sobre o seu mecanismo de ação, este trabalho apresentou evidências *in vitro* da associação direta entre DisBa-01 e o complexo $\alpha_v\beta_3$ /VEGFR2 e consequente inibição das vias de sinalização angiogênicas.

Neste trabalho, foi possível observar que a inibição do *cross-talk* entre $\alpha_v\beta_3$ e VEGFR2 levou à inibição da cascata angiogênica e, conseqüentemente afetou significativamente a reorganização do citoesqueleto de actina e a modulação da migração e adesão das células endoteliais. A Figura 12 representa um esquema do mecanismo repressor da interação desses receptores.

Esses resultados são promissores e geram novos desafios para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

Figura 12. Bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ prejudica a sinalização do VEGF



Fonte: Adaptado de SMYTH; PATTERSON, 2002

A adição da DisBa-01 nas células endoteliais estimuladas com VEGF, resultou na inibição da fosforilação da integrina β_3 , e conseqüente inibição de VEGFR2. Dessa maneira, a sinalização angiogênica ficou prejudicada culminando em diminuição da viabilidade, migração, invasão e adesão celular.