

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS UFSCAR-UNESP**

**DIFERENTES RESPOSTAS À ALTERNAGINA-C, UMA PROTEÍNA TIPO
DESINTEGRINA, EM FIBROBLASTOS, CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA E
CÉLULAS ENDOTELIAIS IN VITRO**

Lívia Mara Santos

SÃO CARLOS- SP

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS UFSCAR-UNESP**

**DIFERENTES RESPOSTAS À ALTERNAGINA-C, UMA PROTEÍNA TIPO
DESINTEGRINA, EM FIBROBLASTOS, CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA E
CÉLULAS ENDOTELIAIS IN VITRO**

Lívia Mara Santos

**Tese de Doutorado apresentada ao
Programa Interinstitucional de Pós-
Graduação em Ciências Fisiológicas
UFSCar-UNESP como requisito
parcial para a obtenção do título de
Doutora em Ciências Fisiológicas.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo

SÃO CARLOS- SP

2013

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

S237dr

Santos, Livia Mara.

Diferentes respostas à alternagina-c, uma proteína tipo desintegrina, em fibroblastos, células tumorais de mama e células endoteliais *in vitro* / Livia Mara Santos. -- São Carlos : UFSCar, 2014.

86 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Câncer. 2. Metaloprotease. 3. Integrina. 4. Alternagina-C. I. Título.

CDD: 616.994 (20^a)

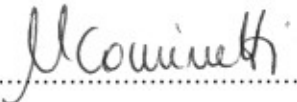
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP


Folha de Aprovação

Tese de Doutorado de Lívia Mara Santos

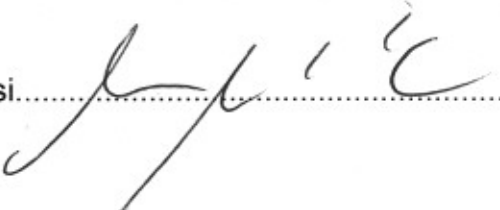
Dia 10/12/2013

Prof.^a Dr.^a Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo.....

Prof.^a Dr.^a Márcia Regina Cominetti.....

Prof.^a Dr.^a Fernanda de Freitas Anibal.....

Prof.^a Dr.^a Fernanda de Assis Araújo.....

Prof.^a Dr.^a Ana Marisa Chudzinski Tavassi.....

DEDICATÓRIA

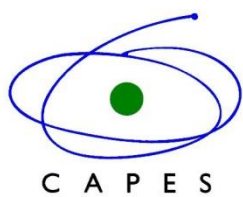
*Dedico esse título aos meus pais Eronílson e Lúcia
pelo amor incondicional, coragem e alicerce
que me deram em toda minha vida .*

Ao meu irmão Lucas por sua amizade e afeto.

*Ao meu namorado Paulo Sérgio Franco Eustáquio pelo amor,
companheirismo, compreensão e alegrias.*

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS



Obrigada Deus porque me iluminou em todos os momentos da minha vida, me guiou e me deu forças para continuar lutando.

Obrigada Pai, Mãe e Lucas minha família linda pelas palavras, atos de amor e carinho que me encorajaram e me deram forças para alcançar esse objetivo.

Obrigada Paulão pelo amor e companheirismo, aprendi e aprendo muito com você todos os dias e quero continuar crescendo e realizando sonhos com você ao meu lado. Obrigada por aguentar meus estresses, me fazer rir e levar com alegria todos os momentos.

Obrigada Prof^a. Dr^a. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo pelos ensinamentos, pelo exemplo de profissional competente e dedicada e por ter me dado a oportunidade de estar em seu laboratório e concretizar meu sonho.

Obrigada a Dr^a. Mônica Costa Iemma, por ter me ajudado e ensinado as técnicas de clonagem, um dos momentos mais relevantes do meu aprendizado.

Obrigada a todos os meus colegas de laboratório que me ajudaram e que me acompanharam nessa trajetória, Natália técnica, "Pati" Patty, Vinícius, Cyntia, Carol, Uliana, em especial a Kelli, Patrícias Godoy e Manzine, Fer (Fernanda Duarte), Camila, Grá, Rafael e Tamires pela ajuda nos experimentos e pelas palavras de apoio e incentivo.

Obrigada Capes, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

*Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente,
mas o que melhor se adapta às mudanças.*

Charles Darwin

RESUMO

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são fatores chave na progressão tumoral, pois participam do remodelamento da matriz extracelular (ECM), liberam citocinas, fatores de crescimento e são reguladas por moléculas da superfície celular (integrinas). As integrinas são os principais receptores de adesão da superfície celular. Elas interagem com proteínas presentes na matriz extracelular conectando as células ao meio no qual estão inseridas possibilitando sua locomoção e a participação em cascatas de sinalização que influenciam a adesão, sobrevivência e a proliferação celular. Importantes inibidores dessas moléculas foram encontrados em venenos de serpentes denominados de desintegrinas. Alternagina-C (ALT-C), uma desintegrina de veneno da serpente *Rhinocerophis alternatus*, tem afinidade para a integrina $\alpha_2\beta_1$, modula a adesão, migração e a proliferação celular mas não há nenhum estudo publicado sobre sua influência na atividade das MMPs. Nesse estudo, a ALT-C foi capaz de aumentar a migração celular em MDA-MB-231 em baixa concentração (10 nM) e diminuir a migração em concentrações mais elevadas (40, 100 e 1000 nM). ALT-C também inibiu a atividade de MMP-9 em meio condicionado de células de carcinoma de mama (MDA-MB-231) e atividade de MMP-2 em meio condicionado de fibroblastos e células endoteliais microvasculares humanas (HMEC-1). A desintegrina também foi capaz de modular a expressão de genes angiogênicos como VEGF, c-MYC, MMP-2 e MMP-9 e inibir a transmigração das células tumorais através das células endoteliais. Conclui-se que a ALT-C atua no remodelamento da matriz extracelular do microambiente tumoral por modular a atividade de MMPs e a expressão de genes angiogênicos essenciais no crescimento tumoral, bem como diminuindo a migração celular.

Palavras-chave: microambiente tumoral, MMPs, desintegrina, integrina $\alpha_2\beta_1$

ABSTRACT

Matrix metalloproteinases (MMPs) are key factors in tumor progression that allow tumor cells to modify the extracellular matrix (ECM) and to release cytokines, growth factors being activated by cell surface molecules such as the integrins. Integrins are major adhesion receptors of cell surface that connect the cells to the external environment enabling its movement. Integrins activate signaling cascades that influence the adhesion, survival and cell proliferation. Important inhibitors of these molecules were found in snake venoms called disintegrins. Alternagin-C (ALT-C) a disintegrin from *Rhinocerophis alternatus* snake venom has affinity with $\alpha_2\beta_1$ integrin therefore modulating cell adhesion, migration and proliferation. However, the effect of ALT-C on MMP activity has not been described yet. Here, we have found that, ALT-C increased cell migration in MDA-MB-231 at lower concentration (10 nM) and it decreased cell migration at higher concentrations (40, 100 and 1000 nM). ALT-C was able to inhibit MMP-9 activity in human breast cancer (MDA-MB-231) conditioned medium and MMP-2 activity in fibroblastas and human microvascular endothelial cells (HMEC-1) conditioned medium. ALT-C also modulated the expression of angiogenic genes such as VEGF, c-MYC, MMP-2 and MMP-9 and it was able to inhibit transendothelial migration of MDA-MB-231 cells at all concentrations (10, 40, 100 and 1000 nM). In conclusion, ALT-C affects the extracellular matrix remodeling by modulating the activity of MMPs and expression of angiogenic genes essential for tumor growth as well as decreased cell migration.

Key words: tumor microenvironment, MMPs, disintegrin, $\alpha_2\beta_1$ integrin

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: MICROAMBIENTE TUMORAL	18
FIGURA 2: FATORES ANGIOGÊNICOS E ANTI-ANGIOGÊNICOS ENDÓGENOS.....	20
FIGURA 3: PRINCIPAIS EVENTOS DA METÁSTASE.....	23
FIGURA 4: PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DA MIGRAÇÃO CELULAR	25
FIGURA 5: ATIVAÇÃO E SINALIZAÇÃO BIDIRECIONAL DAS INTEGRINAS.	27
FIGURA 6: CLUSTERIZAÇÃO DE INTEGRINAS.	28
FIGURA 7: EXEMPLOS DE MEDICAMENTOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS DE VENENO DE SERPENTE.....	32
FIGURA 8: TRANSCRIPTOMA DO VENENO DA <i>RHINOCEROPHIS ALTERNATUS</i>	33
FIGURA 9: CLASSES DE SVMPS..	34
FIGURA 10: INTERAÇÃO PROTEÍNAS DE VENENO DE SERPENTE COM INTEGRINAS E TIPOS CELULARES ESPECÍFICOS.....	36
FIGURA 11: SEQUÊNCIA CODIFICADORA DA ALT-C ORIGINADA DA BIBLIOTECA DE cDNA.....	49
FIGURA 12: CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM EM VETOR PGEM- T <i>EASY</i>	50
FIGURA 13: MAPA DO VETOR PGEX4T-1 EM FUSÃO COM GST.....	51
FIGURA 14: CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM EM VETOR PGEX-4T-1.	53
FIGURA 15: TESTE DE EXPRESSÃO.	54

MOTIVOS ADESIVOS DAS DESINTEGRINAS

ECD	Ácido glutâmico - Cisteína - Ácido aspártico
DCD	Ácido aspártico - Cisteína - Ácido aspártico
KTS	Lisina - Treonina - Serina
RTS	Arginina - Treonina - Serina
MVD	Metionina - Valina - Ácido aspártico
MLD	Metionina - Leucina - Ácido aspártico
KGD	Lisina - Glicina - Ácido aspártico
MGD	Metionina - Glicina - Ácido aspártico
VGD	Valina - Glicina - Ácido aspártico
WGD	Triptofano - Glicina - Ácido aspártico
RGD	Arginina - Glicina - Ácido aspártico

LISTA DE ABREVIATURAS

Ang-2	<i>Angiopoietin-2</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
cdNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
c-MYC	<i>myelocytomatosisviral oncogene homolog (avian)</i>
CRISP	Proteína Secretora Rica em Cisteína
DisBa-01	Desintegrina de <i>Rhinocerosphis alternatus</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EGF	<i>Epithelial Growth Factor</i>
EMT	<i>Epithelial Mesenchymal Transition</i>
FACs	Fibroblastos Asociados a Carcinomas
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GST	Glutathiona-S-transferase
HIF-1	<i>Hypoxia Inducing Factor-1</i>
HMEC-1	<i>Human Microvascular Endothelial Cell</i>
HUVECs	<i>Human Umbilical Vascular Endothelial Cells</i>
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
LAO	L-aminoácido oxidase

MATs	Macrófagos Associados ao Tumor
MEC	Matriz Extracelular
MET	<i>Mesenchymal Epithelial Transition</i>
MMP	Metalopectidases de Matriz
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PLA2	Fosfolipase A2
PPB	Peptídeos Potenciadores de Bradicinina
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SVMP	<i>Snake Venom Metalloprotease</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TIMPs	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteases</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
X-GAL (BCIG)	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1 <i>Câncer</i>	17
1.2 <i>Microambiente tumoral</i>	17
1.3 <i>Angiogênese</i>	20
1.4 <i>Metástase</i>	22
1.5 <i>Migração Celular</i>	24
1.6 <i>Integrinas</i>	26
1.7 <i>Metaloproteases</i>	28
1.8 <i>Medicamentos E veneno de serpente</i>	30
1.9 <i>Snake Venom Metalloproteases (SVMPs)</i>	33
1.10 <i>Desintegrinas</i>	35
1.11 <i>Alternagina-C</i>	37
2. OBJETIVO GERAL.....	38
2.1 <i>Objetivos específicos</i>	38
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
4. CAPÍTULO I: CLONAGEM DA ALTERNAGINA-C.....	48
4.1 <i>Metodologia</i>	48
4.1.1 <i>Obtenção da alternagina-C recombinante</i>	48
4.1.2 <i>Subclonagem em vetor de expressão</i>	48
4.1.3 <i>Amplificação, digestão e ligação</i>	51
4.1.4 <i>Preparação de células competentes</i>	51
4.1.5 <i>Transformação por choque térmico</i>	52
4.1.6 <i>Expressão heteróloga</i>	52
4.2 <i>Resultados</i>	53

<i>4.2.1 Clonagem e expressão</i>	53
<i>4.3 Conclusão</i>	54
<i>5. CAPÍTULO II: MANUSCRITO</i>	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Nas últimas décadas, o câncer converteu-se em um evidente problema de saúde pública, sendo estimados 27 milhões de casos novos para o mundo até o ano de 2030 (World Health Organization, 2011). O câncer é um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2012).

Estimativas de 2012 apontaram os 5 tumores mais incidentes no Brasil para o sexo masculino, câncer de pele não melanoma (63 mil casos novos), próstata (60 mil), pulmão (17 mil), cólon e reto (14 mil) e estômago (13 mil). Para o sexo feminino destacaram-se os tumores de pele não melanoma (71 mil casos novos), mama (53 mil), colo do útero (18 mil), cólon e reto (16 mil) e pulmão (10 mil) (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2012).

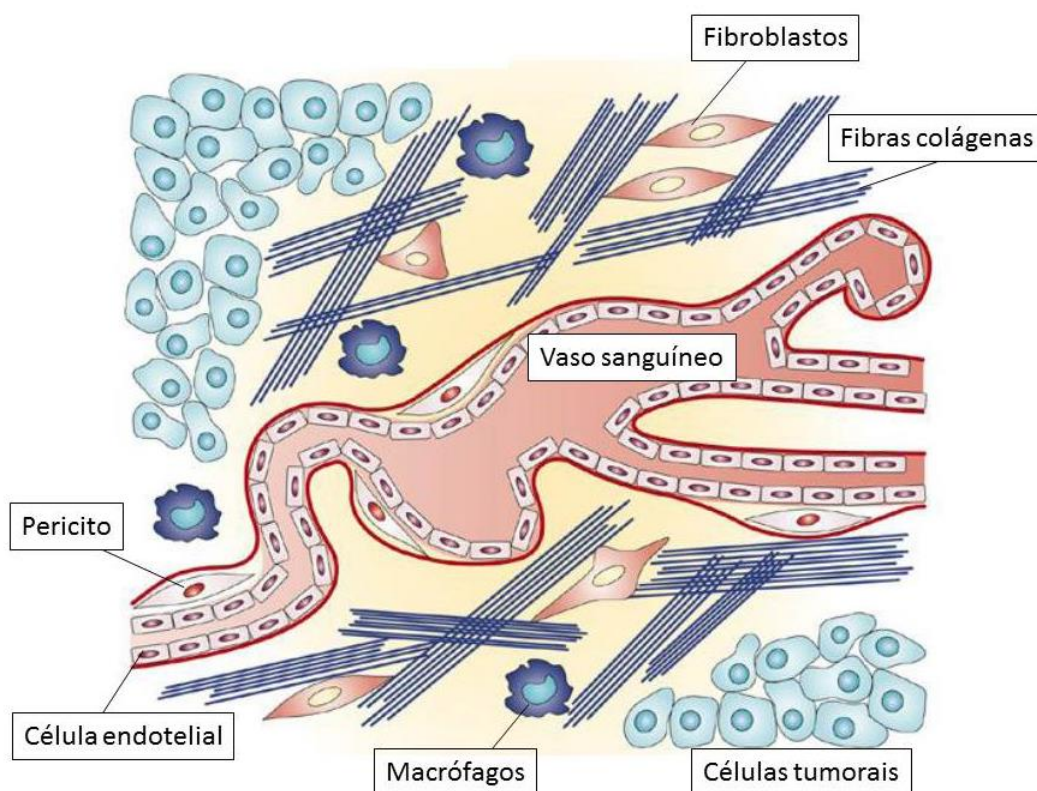
Alguns dos grandes desafios do combate ao câncer são a compreensão e o controle deste tipo de doença altamente complexa que relaciona fatores socioculturais com fatores genéticos, epigenéticos e moleculares (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2012). Esses fatores conferem as células cancerígenas capacidade de proliferação, adaptação ao microambiente e invasão dos tecidos vizinhos, promovendo a formação de uma massa tumoral em contínuo crescimento (STRATTON et al., 2010).

1.2 MICROAMBIENTE TUMORAL

O microambiente no qual o tumor está presente é composto por diferentes elementos que incluem a matriz extracelular (MEC), fatores de crescimento, citocinas,

células inflamatórias, células endoteliais, fibroblastos, dentre outras moléculas (Figura 1). Entre eles, ocorre uma comunicação capaz de estimular o crescimento do tumor primário e modular a capacidade metastática de cada câncer (JOYCE & POLLARD, 2009).

FIGURA 1: Microambiente tumoral mostrando fibroblastos, macrófagos, células tumorais e endoteliais, fibras colágenas, pericitos e a densidade do vaso sanguíneo aumentada (modificado de KALLURI & ZEISBERG, 2006).



O microambiente celular normal pode inibir a proliferação celular tumoral e a formação do câncer (POLYAK; HU, 2005), mas na medida em que o tumor aumenta, reações inflamatórias ocorrem no local e sobrepõe-se a influência do microambiente, fazendo com que as células normais se tornem promotoras do crescimento tumoral (JOYCE & POLLARD, 2009).

A MEC é responsável pela manutenção da estrutura de órgãos, tecidos e células. Ela pode servir como um reservatório ou matriz provisória para fatores de crescimento,

proteínas como colágeno, fibronectina, laminina, glicoproteínas e proteoglicanos produzidos principalmente por fibroblastos e células endoteliais. Proteomas de MEC já mostraram que sua estrutura é composta por mais de 300 proteínas (SCHULTZ & WYSOCKI, 2009; KANDASWAMY et al., 2012). Essas proteínas têm funções reguladoras como a modulação da interação célula-célula e célula-matriz, além de contribuírem para determinados comportamentos das células como angiogênese, proliferação, *epitelial-mesenquimal transition* (EMT) que é importante durante a metástase e sobrevivência celular, bem como a motilidade e degradação da MEC (CHONG et al., 2012). A MEC também está envolvida na transdução de sinais para o meio intracelular através de receptores de adesão (integrinas) (BOUDREAU; JONES, 1999). A adesão celular é um importante regulador do comportamento neoplásico, particularmente na invasão e metástase (HU; POLYAK, 2008).

Os fibroblastos presentes na MEC são responsáveis pelas mudanças na arquitetura e fenótipo tumoral. Fibroblastos normais podem ser ativados por fatores de crescimento específicos dentro do estroma tumoral e se tornarem fibroblastos associados a carcinomas (FACs). Em geral, os fibroblastos têm atividade supressora de tumor, mas enquanto FACs têm propriedades de promoção tumoral (COULSON-THOMAS et al., 2010).

Os macrófagos assim como os fibroblastos, também podem ser ativados e se tornarem macrófagos associados ao tumor (MATs). Estas células, além de aumentarem a viabilidade das células cancerígenas na circulação, auxiliam inicialmente no crescimento das células tumorais no novo sítio metastático (RICHARDS et al., 2012).

Portanto, a MEC pode desempenhar diferentes funções, dependendo de diversos fatores do microambiente tumoral como os diferentes tipos de células. Os reguladores

naturais da homeostase do tecido podem impedir os processos envolvidos na progressão tumoral. No entanto, quando esses reguladores fisiológicos reduzem sua eficácia homeostática, o microambiente do tumor pode começar a agir e ocorre a promoção do crescimento e desenvolvimento tumoral (GOMES et al., 2013).

1.3 ANGIOGÊNESE

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes e acontece quando há o desequilíbrio de fatores pró e anti-angiogênicos. Esse processo é crucial para o desenvolvimento normal e crescimento do organismo (FERRARA, 2010). O desequilíbrio desse processo favorece condições patológicas como progressão, propagação e crescimento de tumores, cegueira, isquemia entre outras doenças (RAICA et al., 2009).

O processo angiogênico é mediado principalmente através da estimulação de fatores de crescimento e outras moléculas secretadas. O fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A) é o principal representante desse processo, produzido pelas células tumorais e células do microambiente tumoral como os fibroblastos, é um potente regulador tanto em processos fisiológicos como patológicos (DREVS, 2008; GOMES et al., 2013). Existem várias outras moléculas que regulam a angiogênese (MAKRILIA et al., 2009) (Figura 2).

FIGURA 2: Fatores angiogênicos e anti-angiogênicos endógenos (modificado de MAKRILIA et al., 2009).

Fatores angiogênicos	Fatores anti-angiogênicos
Fator de crescimento endotelial vascular	angiostatina
Angiopietinas	endostatina
Fatores de crescimento de fibroblastos	Trombospontina 1-2
Fatores de crescimento endotelial derivados de plaquetas	Vasostatina
Fator de crescimento transformante α/β	Fator associado a plaqueta -4
Fator de necrose tumoral α	Osteopontina
Fator de crescimento epidermal	Inibidor tecidual de metaloproteases
Ciclooxigenase -2	
Interleucina 6-8	Interleucina 1-2

A hipóxia estimula a produção de fatores angiogênicos que se ligam às células endoteliais estimulando crescimento, desenvolvimento e cicatrização de feridas em processos normais. Mas também pode induzir a expressão das vias tumorigênicas incluindo aquelas que regulam a angiogênese, proliferação e morte celular (HARRIS, 2003). No tumor, apesar da expressão de gene angiogênicos aumentada, novos vasos resultantes dessa anormalidade não conseguem realizar uma perfusão adequada no tumor, o que leva a uma hipóxia elevada mesmo na presença de densidade crescente de novos vasos. Esse estado hipóxico por sua vez, induz novamente a formação de novos vasos (KAUR et al., 2009). Um importante mediador da hipóxia é o HIF-1 (*hypoxia-inducible factor-1*). Ele é composto por subunidades HIF-1 α e HIF-1 β , ambas são constitutivamente expressas em vários tipos de tumores. Em condições normais de oxigenação, HIF-1 α é dificilmente detectável porque é alvo da destruição rápida por meio de uma ubiquitina ligase E3 contendo pVHL (von Hippel-Lindau proteína supressora de tumor). Sob condições hipóxicas, a expressão de HIF-1 α é aumentada como resultado da diminuição da ubiquitinação e degradação de HIF-1 α , por

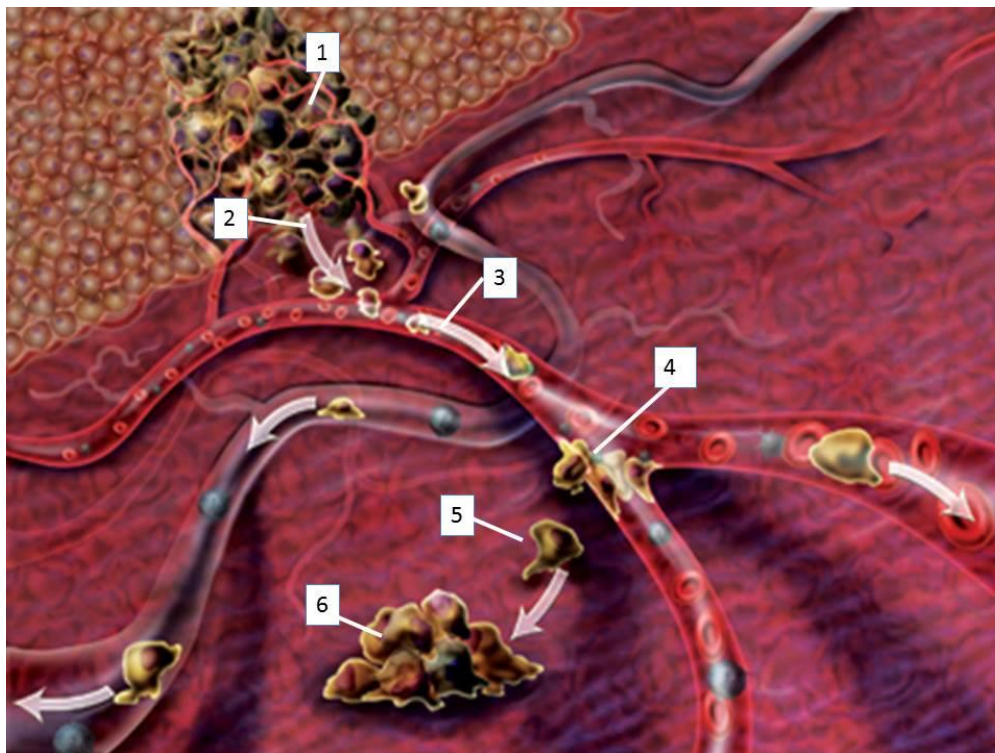
consequência a transcrição de VEGF-A é aumentada (TAKAHASHI; SHIBUYA, 2005).

Toda a arquitetura de suprimento das células neoplásicas com nutrientes e oxigênio através da disseminação dos vasos favorece o crescimento do tumor aumentando a quantidade de células que entram e sobrevivem na circulação e consequentemente as chances de ocorrer metástases (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

1.4 METÁSTASE

A metástase é responsável por 90% das mortes de pacientes acometidos por câncer (YILMAZ et al., 2007) e é facilitada pelas interações célula-célula entre as células tumorais e o endotélio em tecidos distantes. Ela é composta por uma complexa cascata de eventos: as células se soltam do tumor primário, migram, invadem vasos linfáticos e sanguíneos e disseminam-se para as zonas distantes, onde crescem formando tumores secundários (OPPENHEIMER, 2006) (Figura 3).

FIGURA 3: Principais eventos da metástase. **1-Tumor primário**, **2-Células tumorais se destacam do tumor e alcançam os vasos sanguíneos**, **3-Células tumorais viajam pela corrente sanguínea**, **4-Células tumorais se aderem a parede dos vasos**, **5-Células tumorais invadem os tecidos**, **6-Tumor secundário** (modificado de <http://scisoundoff.wordpress.com/2012/11/06/hallmarks-of-cancer-1-invasion-and-metastasis/>).



Para que ocorra metástase, as células tumorais precisam alterar sua morfologia para facilitar sua dispersão e motilidade, processo chamado de *epithelial mesenchymal transition* (EMT), o qual induz a mudança de fenótipo epitelial para mesenquimal, levando a perda da polarização celular, redução na expressão de caderinas, aparecimento de fibras de *stress* e alteração das junções celulares (NISTICÒ et al., 2012). As células perdem a capacidade de aderir e adquirem características migratórias e invasivas necessárias para superar barreiras físicas e atingir seu sítio metastático (GEIGER; PEEPER, 2009).

Para as células se infiltrarem pelas paredes dos vasos, propriedades invasivas específicas são fornecidas por genes que estão desregulados nas células tumorais. A estrutura e composição das paredes dos capilares podem variar em diferentes órgãos, as

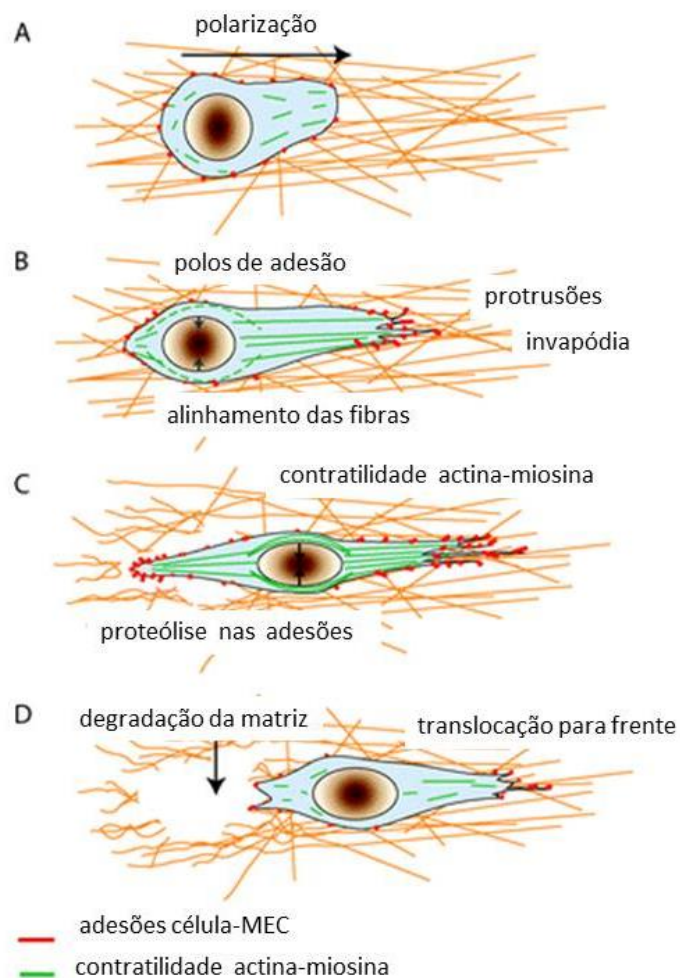
funções necessárias para a infiltração metastática, sobrevivência e colonização pode também variar de acordo com o órgão alvo (NGUYEN et al., 2009). Uma vez que as células se encontram dentro de vasos sanguíneos ou linfáticos, elas são protegidas por agregados de plaquetas e coágulos de fibrina que promovem sobrevivência celular (JOYCE & POLLARD, 2009).

1.5 MIGRAÇÃO CELULAR

A motilidade celular é essencial para a metástase. Também é crítica para a funcionalidade do sistema imunitário, permite as interações célula-célula que moldam as respostas imunes, morfogênese embrionária, desenvolvimento do sistema nervoso e cicatrização. Em situações patológicas, o movimento celular é desregulado e contribui para a metástase das células tumorais (RØRTH, 2011).

A migração é um movimento dirigido das células em um substrato como membranas basais e fibras da MEC. Apesar das dificuldades em definir diferentes modos de migração, é um fato que a capacidade de migrar é pré-requisito para invadir, uma célula não pode invadir sem migrar, mas pode mover-se sem invasão (KRAMER et al., 2013). Aspectos básicos da migração estão bem estabelecidos. As células apresentam uma polaridade direcional que ajuda no alongamento celular através dos filamentos de actina, há a formação do invapódia na frente de migração da célula que promove a adesão com as fibras da MEC puxando todo o corpo celular e cauda para frente, podendo ocorrer a degradação da matriz. A ligação das células com a matriz acontece principalmente por meio das integrinas que estão presentes na superfície celular mediando a interação dos componentes da matriz com a actina do citoesqueleto, possibilitando a tração necessária para o movimento migratório (Figura 4).

FIGURA 4: Principais características da migração celular (modificado de PATHAK & KUMAR, 2011).



Características físicas e moleculares do ambiente juntamente com determinantes celulares intrínsecos influenciam no modo de migração (WOLF; FRIEDL, 2011).

Existem dois tipos de migração: a coletiva e a migração individual. A migração individual pode ser dividida em amebóide e mesenquimal. Movimento amebóide é caracterizado por células em movimentos arredondados, corpos em formato elipsóide sem o envolvimento de adesões focais e fixação celular. Exemplos de células que realizam esse movimento são células embrionárias, leucócitos e algumas células tumorais (BRÁBEK et al., 2010). A migração mesenquimal envolve forte ligação focal com a matriz extracelular, contratilidade do citoesqueleto e corpos alongados de células

fusiformes (fibroblastos e algumas células tumorais). Essas células se locomovem através da adesão de receptores celulares de superfície (integrinas) pelas fibras da MEC e auxílio de proteases como as metaloproteases de matriz (MMPs) que estão co-localizadas com as integrinas nos sítios de adesão (complexos focais) clivando os componentes da matriz para facilitar a passagem das células (FRIEDL; WOLF, 2003). Migração coletiva é caracterizada pelo movimento celular através da MEC com a preservação das junções celulares. Este tipo de movimento de um grupo de células que estão fisicamente ligados um ao outro, ocorre em tumores de origem epitelial e melanoma (KRAMER et al., 2013).

1.6 INTEGRINAS

Integrinas são receptores de adesão celular heterodiméricos transmembrana (HYNES, 1987). São compostos por 18 subunidades α e 8 β , formando pelo menos 24 heterodímeros diferentes (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010). A porção extracelular é mais longa, cada heterodímero possui afinidade por diferentes seqüências adesivas. Uma parte delas se liga a moléculas que possuem a seqüência Arg-Gly-Asp (RGD) no motivo adesivo, outras são receptores para colágeno, laminina, outras proteínas que compõe a MEC e existem ainda algumas que são receptores específicos para os leucócitos (BARCZYK et al., 2010)

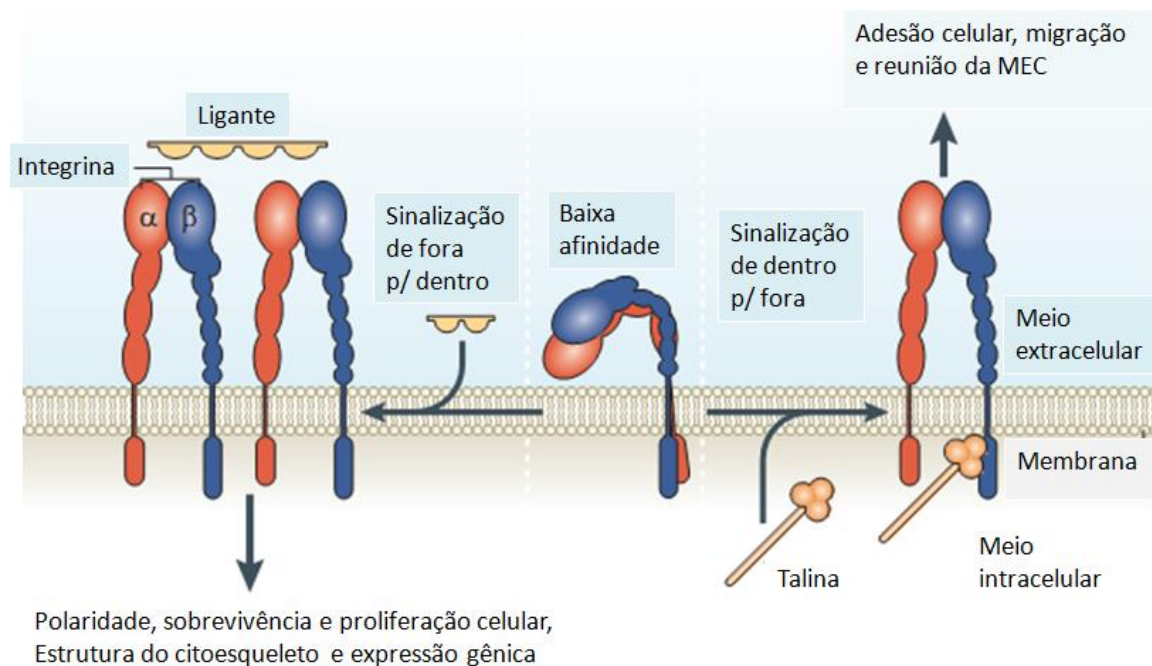
A superexpressão das integrinas $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_v\beta_3$, e $\alpha_v\beta_6$ está relacionada a progressão tumoral em vários tipos de tumores (melanoma, câncer de mama, câncer de próstata e cólon), pois aumentam a motilidade, o potencial invasivo e a resistência as terapias (YUE et al., 2012). A expressão de outras integrinas como $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_1\beta_1$ é

diminuída em células tumorais, o que potencialmente pode aumentar a disseminação dessas células (SHIN et al., 2012).

Dependendo do ambiente, o perfil de integrinas pode ser alterado rapidamente. Essas mudanças são capazes de alterar significativamente o comportamento celular dado que cada integrina regula diferentes funções (SHIN et al., 2012).

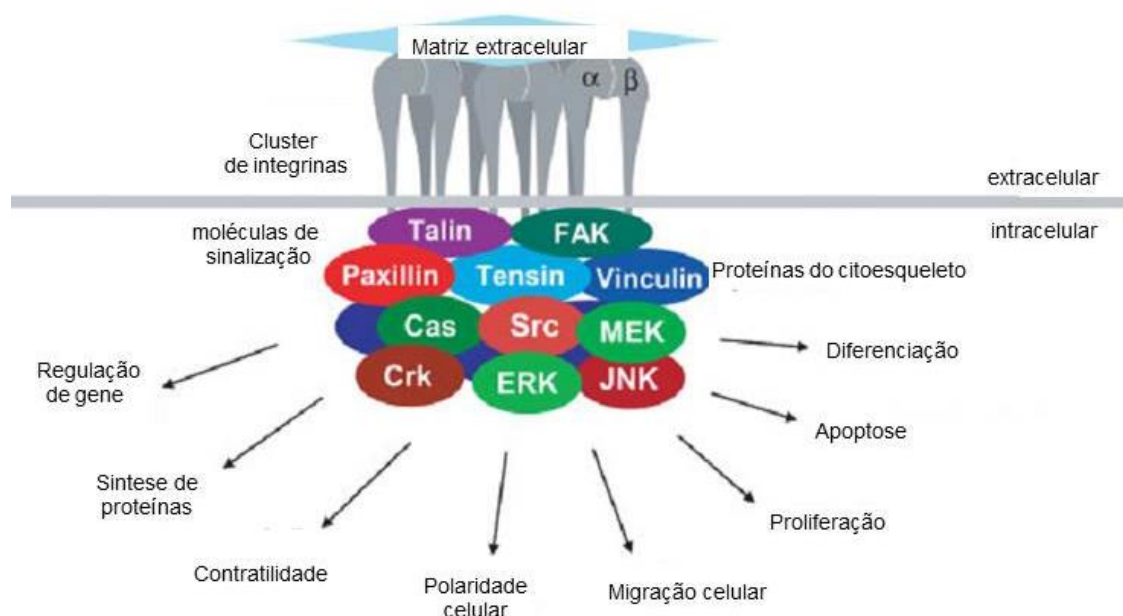
As integrinas funcionam de forma bidirecional, transmitindo sinais tanto de dentro para fora (*inside-out*) como de fora para dentro (*outside-in*) das células. Eventos intracelulares ativam a sinalização *inside-out* por meio da ligação de proteínas intracelulares. O heterodímero tem a conformação alterada e aumenta sua afinidade por ligantes extracelulares. Na sinalização *outside-in*, elas agem como receptores interagindo com seus ligantes extracelulares e ativando vias de sinalização intracelulares (HYNES, 2002; SHATTIL et al., 2010) (Figura 5).

FIGURA 5: Ativação e sinalização bidirecional das integrinas. As integrinas podem ser ativadas tanto de dentro para fora de células, quanto de fora para dentro (modificado de SHATTIL et al., 2010).



Os complexos de adesão formados pelas integrinas são conhecidos como adesões focais ou “adhesome”, pelo menos 156 componentes interligados por centenas de interações (YUE; ZHANG; CHEN, 2012). Alguns desses componentes são a talina, paxilina, filamina, *integrin-linked kinase (ILK)* e *focal adhesion kinase (FAK)*. A ativação das integrinas e interação com seus ligantes podem levar ao desenvolvimento de *clusters*, agregados de integrinas que formam pontos focais de adesão e ativam vias intracelulares (Figura 6).

FIGURA 6: Clusterização de integrinas. Ativação e sinalização de integrinas (modificado de BERRIER & YAMADA, 2007).



O envolvimento das integrinas e outros receptores de adesão conduz ao recrutamento de proteases para sítios de ligação da superfície, o que, por sua vez, degradam componentes da matriz extracelular que estão em estreita proximidade com a superfície celular (YUE ET AL., 2012).

1.7 METALOPROTEASES

Se uma célula não possui a maquinaria enzimática necessária para modificar a matriz que a rodeia, ela permanece redonda, incapaz de continuar o processo porque a matriz se torna impenetrável, conseqüentemente ela não se divide e não migra.

As metaloproteases (MMPs) facilitam a passagem das células por entre as fibras da MEC pela degradação de proteínas da matriz como fibronectina, colágeno e laminina, e liberam fatores de crescimento que irão atuar nas próprias células estimulando a produção de mais MMPs, migração e invasão celular (YUE; ZHANG; CHEN, 2012). As MMPs são endopeptidases dependentes de zinco, produzidas sob a forma de precursores inativos. Possuem um peptídeo sinal, que direciona a proteína para o retículo endoplasmático, um pró-peptídeo que a mantém sob a forma inativa e o domínio catalítico que contém o motivo de ligação ao zinco. Possuem ainda o domínio tipo hemopexina no C-terminal, que proporciona especificidade na ligação com inibidores e substratos. São ativadas no momento em que ocorre a dissociação entre um resíduo de cisteína presente no pró-domínio e o zinco do domínio catalítico ou ainda uma por uma modificação química do resíduo de cisteína. A ativação pode ocorrer tanto dentro como fora da célula, sendo a maioria ativada no meio extracelular por meio de outras MMPs ativas ou serinoproteases (KESSENBROCK et al., 2010).

A inibição da atividade dessas proteases ocorre pela ação dos tecidos inibidores de metaloproteinases (TIMPs), moléculas encontradas na maioria dos tecidos e fluidos corporais. Elas são uma família de quatro membros, TIMPs 1, 2, 3 e 4, todas secretadas sob a forma solúvel, com exceção da TIMP-3 que está ligada a MEC. Em conjunto esses inibidores agem equilibrando a síntese e degradação produzida pelas MMPs que é crucial para o funcionamento normal dos órgãos (BOURBOULIA et al., 2010).

As MMPs podem ser classificadas de acordo com sua especificidade ao substrato: collagenases (MMP-1, -8 e -13), gelatinases (MMP-2 e -9), estromelinas (MMP-3, -10 e -11) e um grupo heterogêneo contendo matrilisina (MMP-7), metaloblastase (MMP-12), enamelisina (MMP-20), endometase (MMP-26) e epilisina (MMP-28). As metaloproteases tipo membrana (MT-MMPs) são MMP-14, -15, -16, -17, -24 e -25, e são consideradas uma classe separada. Elas estão ancoradas na membrana por um domínio transmembrana, seguido por uma cauda citoplasmática intracelular que contém três sítios de fosforilação que pode ser importante para a localização da enzima na superfície celular. (KLEIN; BISCHOFF, 2011).

As MMPs podem interagir com receptores da superfície celular (integrinas) e desencadear vias de sinalização que modulam processos fisiológicos e patológicos (YUE; ZHANG; CHEN, 2012). Estudos têm mostrado expressão elevada de integrina $\alpha_v\beta_6$ em células de câncer de ovário que se relaciona com o aumento da expressão de pró-MMP-2 e pró-MMP-9, e a integrina $\alpha_v\beta_3$ é correlacionada com a expressão aumentada de MMP-2 em células de câncer de mama (YUE; ZHANG; CHEN, 2012).

Por causa dessa relação bem estabelecida entre MMPs e câncer, é importante o desenvolvimento de terapias que inibam a atividade dessas enzimas no microambiente tumoral. Para isso, cientistas descobriram no veneno das serpentes, uma fonte rica de biomoléculas que podem servir de protótipos para futuros medicamentos.

1.8 MEDICAMENTOS E VENENO DE SERPENTE

Venenos de serpentes possuem centenas de compostos farmacologicamente ativos que desencadeiam os mais complexos efeitos biológicos (MARCINKIEWICZ, 2013). Sabe-se que aproximadamente 60 espécies de serpentes são peçonhentas (FOX;

SERRANO, 2008) e produzem substâncias capazes de causar alterações no sistema hemostático de suas presas, geralmente pequenos mamíferos, por meio de uma variedade de mecanismos. Estes componentes podem estimular ou inibir várias etapas da hemostasia, como interferindo na cascata de coagulação sanguínea, causando fibrinólise e hipotensão, inclusive alterando a integridade vascular e função plaquetária (VYAS et al., 2013).

O veneno de serpente pode afetar o sistema cardiovascular e as funções sanguíneas, sítios celulares específicos, músculos e o sistema nervoso (VYAS et al., 2013). Apesar do veneno como um todo ser tóxico, seus componentes quando isolados podem ser utilizados para fins terapêuticos, devido a seletividade e efetividade das suas ligações aos receptores, requisitos necessários para um bom fármaco (EBLE, 2010). Proteínas presentes em venenos de serpentes, desde a antiguidade chamaram atenção de pesquisadores por sua complexa composição e baixas concentrações necessárias para obtenção de efeitos biológicos importantes. Alguns exemplos de medicamentos derivados de proteínas extraídas do veneno de serpentes e explorados pela indústria farmacêutica estão listados na figura 7.

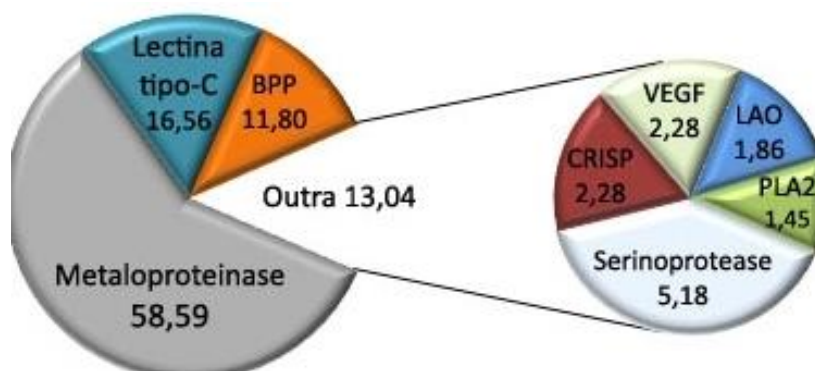
Figura 7: Exemplos de medicamentos derivados de proteínas de veneno de serpente (FERREIRA, 1994; PHILLIPS & SCARBOROUGH, 1997; RASMUSSEN & HUSTED, 2001; HUANG et al., 1992; SCHONI, 2005; KOH & KINI, 2012; MAS-MORUNO et al., 2010).

Medicamento/Nome comercial [®]	Função/Tratamento	Fonte
Captopril/Capoten	Inibidor da enzima conversora de angiotensina / Hipertensão arterial	<i>Bothrops jararaca</i>
Eptifibatide / Integrilin	Inibidor de agregação plaquetária / Infarto do miocárdio	<i>Sistrurus miliaris barbouri</i>
Tirofiban / Aggrastat	Inibidor de Glicoproteína IIb-IIIa / Síndrome coronariana aguda	<i>Echis carinatus</i>
Batroxobin / Defibrase	Inibidor de trombina e protrombina / Acidente vascular cerebral	<i>Bothrops moojeni</i>
Batroxobin / Reptilase	Diagnóstico de desordens na coagulação sanguínea	<i>Bothrops atrox</i>
Cilengitide (fase de testes)	Atividade antiangiogênica / alvo $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ e $\alpha5\beta1$	Pentapeptídeo RGD

Apesar das semelhanças existentes na composição dos venenos de serpentes pertencentes à mesma espécie, variações podem ocorrer de acordo com a origem, habitat, dieta, sexo e idade das serpentes (VYAS et al., 2013).

No transcriptoma da *Rhinocerophis alternatus* produzido em nosso laboratório, oito diferentes categorias de moléculas tóxicas foram encontradas (figura 8).

FIGURA 8: Transcriptoma do veneno da *Rhinocerocephis alternatus*. O gráfico indica as porcentagens dos transcritos de moléculas tóxicas encontradas na biblioteca. Retirado de HIRAYAMA, 2011(dados não publicados).



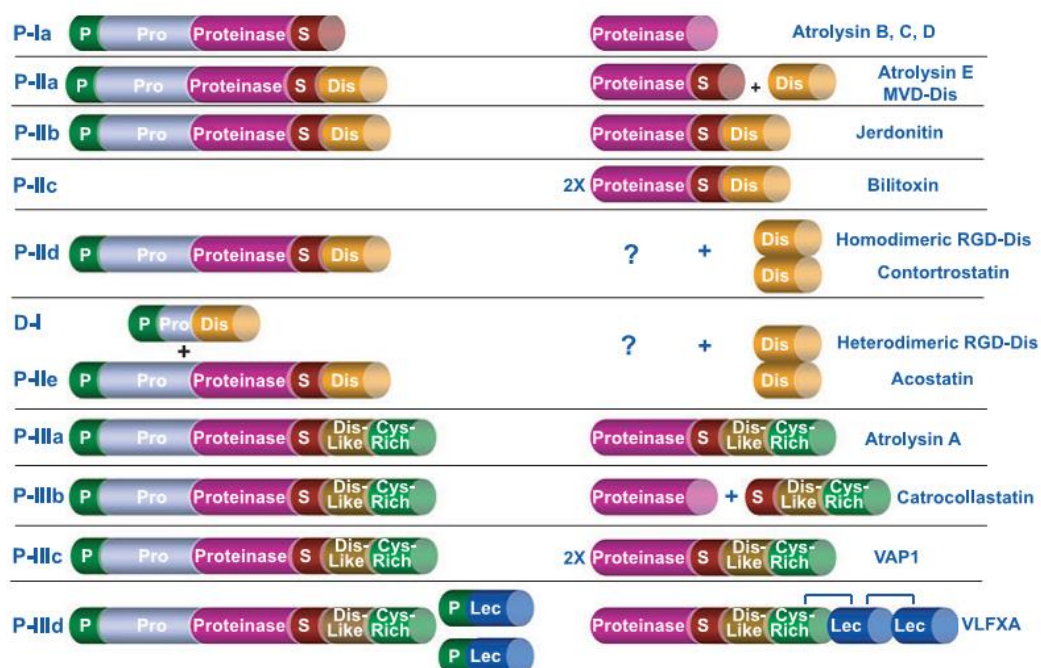
A maior parte dos venenos de serpente é formada por proteases, enzimas classificadas em serinoproteínases tripsina-like (SVSPs, *Snake Venom Serine Proteases*) e metaloproteases (SVMPs, *Snake Venom MetalloProteases*) conforme o seu mecanismo de catálise. A composição da maioria dos venenos de serpente contém pelo menos 30% de SVMPs, sugerindo seu potencial significativo na patogênese relacionadas ao envenenamento, como sangramento, coagulação intravascular, edema, inflamação e necrose (TAKEDA, et al., 2012).

1.9 SNAKE VENOM METALLOPROTEASES (SVMPs)

Ao longo dos últimos 50 anos, dezenas de metaloproteases de venenos de serpentes (SVMPs) foram isoladas a partir de veneno bruto de serpentes. A maioria destas SVMPs têm sido caracterizadas como hemorrágicas, mas existem outras com atividades diferentes como fibrinogenolítica, fibrinolítica, apoptose, ativação de protrombina, a ativação do Fator X e a inibição da agregação de plaquetas (FOX; SERRANO, 2009).

As SVMPs são proteínas com atividade endopeptidase, com um domínio conservado para a ligação ao zinco (HEXXHXXGXXH) e sua atividade é inibida pela presença de quelantes desse metal, por isso também chamadas de zinco-metaloproteases, ou seja, enzimas dependentes de zinco e possuem múltiplos domínios (FOX & SERRANO, 2008) (Figura 9).

FIGURA 9: Classes de SVMPs. Metaloproteases antes e depois do processamento. Os pontos de interrogação representam compostos ainda não identificados no veneno e o S situado entre os domínios significa *spacer*. Modificado de Fox & Serrano, 2008).



No caso do domínio desintegrina, derivados do processamento da classe P-II, a sequência mais encontrada é a RGD (Arg-Gly-Asp) (SELISTRE-DE-ARAÚJO et al., 2005; RAMOS et al., 2008). As proteínas tipo-desintegrinas provenientes da classe P-III, normalmente possuem as sequências DCD (Asp-Cys-Asp) ou ECD (Glu-Cys-Asp).

Uma segunda classificação para as SVMPs da classe P-III é baseada na sequência presente nos resíduos de 373 a 394, as que possuem essa região conservada são classificadas como HCR (*Highly Conserved Region*), as com sequência não

conservada como HVR (*Hyper Variable Region*). Acredita-se que essa região seja responsável pela especificidade por substratos de seu grupo metaloprotease, entretanto, os autores afirmam que mais estudos são necessários para a confirmação dessa hipótese (MUNIZ et al., 2008).

1.10 DESINTEGRINAS

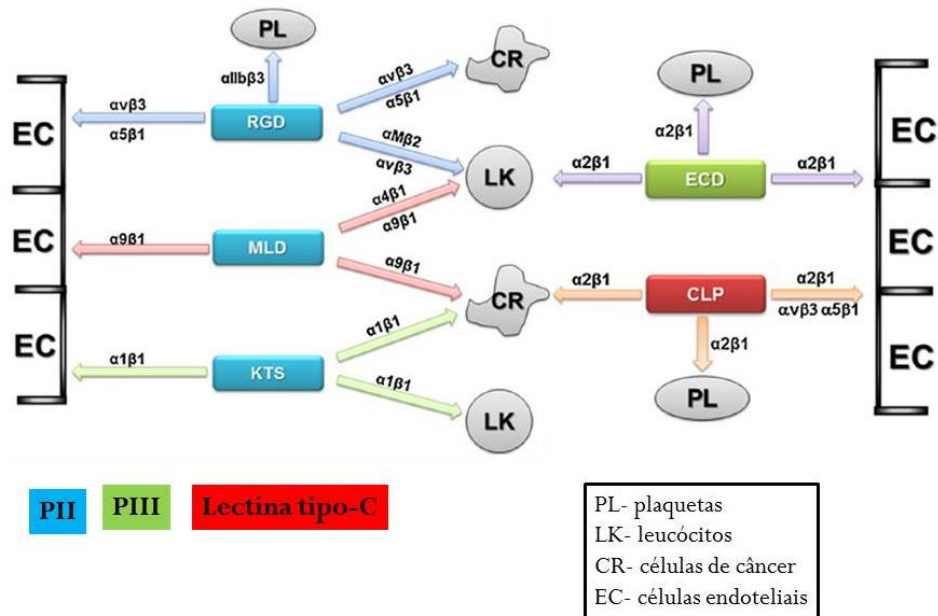
As pesquisas com desintegrinas começaram aproximadamente há 25 anos e conduziram novos estudos levando a descoberta de novas classes de proteínas (CALVETE, 2013).

As desintegrinas foram caracterizadas como um grupo de polipeptídios ricos em resíduos de cisteína, de baixa massa molecular, capazes de inibir a agregação plaquetária com alta especificidade e eficiência (GOULD et al., 1990).

Essas moléculas podem ser divididas em subfamílias de acordo com a sua estrutura e função. Estruturalmente, desintegrinas são monoméricas e dimericas. Desintegrinas monoméricas são agrupadas de acordo com seu comprimento de cadeia polipeptídica e o número de cisteínas: desintegrinas curtas (8 cisteínas), médias (12 cisteínas) e longas (14 cisteínas). Cada subunidade de desintegrina dimerica contém 10 cisteínas (MARCINKIEWICZ, 2013). A classificação funcional é determinada pela presença de um padrão tripeptídico no local ativo. As desintegrinas constituídas pelos tripeptídeos KTS e RTS se ligam à integrina $\alpha_1\beta_1$, aquelas com tripeptídeo ECD se ligam a $\alpha_2\beta_1$, ambos receptores específicos de colágeno. As desintegrinas com motivo MVD ainda não possuem ligantes determinados, porém de acordo com alguns ensaios, a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ pode ser um de seus alvos. O domínio MLD se liga as integrinas $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_9\beta_1$, atuando em leucócitos. As desintegrinas que possuem os motivos KGD, MGD,

VGD e WGD compartilham o mesmos alvos do motivo RGD, as integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_5\beta_1$ (CALVETE et al., 2005) (Figura 10).

Figura 10: Interação proteínas de veneno de serpente com integrinas e tipos celulares específicos (modificado de Marcinkiewicz, 2013).



As desintegrinas RGD possuem afinidade principalmente pelas integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$ que são os receptores de vitronectina, fibronectina e fibrinogênio, respectivamente, e estão envolvidas na agregação de plaquetas, proliferação celular, apoptose, adesão, migração e angiogênese (MINEA et al., 2010; MONTENEGRO et al., 2012).

A caracterização de antagonistas de integrinas é um assunto de grande interesse, e desintegrinas são candidatas a serem utilizadas como ferramentas eficazes para a terapia do câncer. Por outro lado, a atividade biológica de algumas desintegrinas ainda não é muito bem conhecida (HIGUCHI et al., 2011).

Várias desintegrinas com domínios desintegrina-like/rico em cisteína (desintegrinas ECD), têm sido isoladas como jararagina-C (USAMI et al., 1994),

alternagina-C (SOUZA et al., 2000), catrocollastatina-C (CALVETE et al., 2000), halicetina (LIU et al., 2000), leberagina-C (LIMAM et al., 2010). Essas moléculas com exceção da leberagina-C, são capazes de inibir a agregação plaquetária induzida pelo colágeno I pela ligação à integrina $\alpha_2\beta_1$. Esse receptor de colágeno desempenha papel essencial na adesão de células normais e tumorais à matriz extracelular (SELISTRE DE ARAÚJO et al., 2005). Outros estudos mostraram que a integrina $\alpha_2\beta_1$ pode interagir em dois locais diferentes, na jararagina o motivo ECD está localizado no domínio tipo desintegrina e outro motivo localizado no domínio rico em cisteína (TANJONI et al., 2010).

1.11 ALTERNAGINA-C

A alternagina é classificada como uma metaloprotease da classe PIII com massa molecular de 55kDa (SOUZA et al., 2000). Ao sofrer o processamento proteolítico, libera o domínio tipo desintegrina associado ao domínio rico em cisteína chamado de alternagina-C (ALT-C). Foi estimada à ALT-C uma massa molecular de 29kDa e o sequenciamento parcial dos aminoácidos confirmou a presença do motivo ECD semelhante a outras proteínas tipo desintegrinas (SELISTRE-DE-ARAÚJO et al., 2005). Sua estrutura cristalográfica ainda não foi elucidada, mas a estrutura de outras SVMPs pertencentes à mesma classe e com grande homologia na sequência de aminoácidos da molécula, como a jararagina e a bothropasina permite postularmos que sua estrutura tridimensional não seja muito diferente (MUNIZ et al., 2008).

Prévios estudos do nosso laboratório mostraram que a ALT-C tem a capacidade de inibir a adesão ao colágeno tipo I de células tumorais K562 expressando a integrina $\alpha_2\beta_1$ (SOUZA et al., 2000). ALT-C induz a migração de neutrófilos humanos com

polimerização da actina celular (MARIANO-OLIVEIRA et al., 2003). Essa desintegrina foi capaz de inibir a adesão de fibroblastos de rato (NIH-3T3) ao colágeno I envolvendo a integrina $\alpha_2\beta_1$, e também inibir a adesão de várias linhagens tumorais como HeLa (Human Cervix Epithelioid Carcinoma), ECV-304/T24 (Human Bladder Epithelioid Carcinoma) e MDA-MB-231 (Estrogen-independent Breast Human Carcinoma) (COMINETTI et al., 2004). Dependendo da concentração utilizada, a ALT-C pode promover a proliferação de células endoteliais (HUVECs) em baixas concentrações (1-40 nM) e inibir a proliferação celular em altas concentrações (100 nM). Um peptídeo sintetizado a partir da ALT-C mostrou efeitos similares em relação à ALT-C nativa quanto à proliferação celular e à angiogênese (COMINETTI ET AL., 2004; RAMOS et al., 2007).

2. OBJETIVO GERAL

O estudo das desintegrinas tem mostrado grande importância para o aprofundamento na compreensão dos processos intermediados pelas integrinas envolvidas tanto em situações fisiológicas normais como em patológicas. Considerando a relevante ligação entre integrinas, MMPs e a versatilidade da desintegrina ALT-C nos sistemas biológicos, propusemos investigar a relação desses componentes em células de tumor mamário (MDA-MB-231), fibroblastos humanos (FH) e células endoteliais microvasculares humanas (HMEC-1). Em paralelo, clonar, expressar e purificar a ALT-C recombinante, de forma a obter quantidades suficientes da proteína para permitir estudos *in vivo*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar o efeito da ALT-C nativa na atividade de MMP-2 e MMP-9 no meio condicionado das células de câncer de mama, fibroblastos e endoteliais, bem como migração celular, transmigração e expressão gênica de fatores relacionados a angiogênese e metástase (VEGF, MMP-2, MMP-9, c-MYC e ANG-2).

Clonar, expressar e purificar a ALT-C recombinante em sistema procarioto (*E. coli*). A clonagem e a produção dessa desintegrina de forma recombinante em sistema procarioto (bactéria), possibilitaria a obtenção de uma maior quantidade de proteína viabilizando sua caracterização e purificação para a realização de mais ensaios de atividade *in vivo* e *in vitro*, a fim de desvendar seus mecanismos de ação e usufruir de seu enorme potencial de uso clínico no tratamento de várias doenças que envolvam integrinas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARCZYK, M.; CARRACEDO, S.; GULLBERG, D. Integrins. **Cell and tissue research**, v. 339, n. 1, p. 269–80, jan. 2010.

BAUDINO, T. A. et al. c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. **Genes & Development**, v. 16, n. 19, p. 2530–2543, 2002.

BOUDREAU, N. J.; JONES, P. L. Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. **Biochem J**, v. 339, n. Pt 3, p. 481–488, 1999.

BRÁBEK, J. et al. The role of the tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion. **Cell communication and signaling CCS**, v. 8, n. 1, p. 22, 2010.

BRANDVOLD, K. A.; NEIMAN, P.; RUDDLELL, A. Angiogenesis is an early event in the generation of myc-induced lymphomas. **Oncogene**, v. 19, n. 23, p. 2780–2785, 2000.

BROOKS, S. A et al. Molecular interactions in cancer cell metastasis. **Acta histochemica**, v. 112, n. 1, p. 3–25, jan. 2010.

BUCHANAN, C. F. et al. Cross-talk between endothelial and breast cancer cells regulates reciprocal expression of angiogenic factors in vitro. **Journal of cellular biochemistry**, v. 113, n. 4, p. 1142–51, abr. 2012.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–22, 2009.

CALVETE, J. J. et al. The disulfide bond pattern of catrocollastatin C, a disintegrin-like/cysteine-rich protein isolated from *Crotalus atrox* venom. **Protein Science**, v. 9, n. 7, p. 1365–1373, 2000.

CALVETE, J. J. et al. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 8, p. 1063–74, 15 jun. 2005.

CALVETE, J. J. The continuing saga of snake venom disintegrins. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 62, p. 40–9, fev. 2013.

CAREY, C. M. et al. Recombinant rubistatin (r-Rub), an MVD disintegrin, inhibits cell migration and proliferation, and is a strong apoptotic inducer of the human melanoma cell line SK-Mel-28. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 59, n. 2, p. 241–8, fev. 2012.

CHONG, H. C. et al. Matricellular proteins: a sticky affair with cancers. **Journal of oncology**, v. 2012, n. Figure 1, p. 351089, jan. 2012.

COMINETTI, M. R. et al. Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 18, p. 18247–55, 30 abr. 2004.

COULSON-THOMAS, V. J. et al. Fibroblast and prostate tumor cell cross-talk: fibroblast differentiation, TGF- β , and extracellular matrix down-regulation. **Experimental cell research**, v. 316, n. 19, p. 3207–26, 15 nov. 2010.

DALY, C. et al. Angiopoietin-2 functions as an autocrine protective factor in stressed endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 42, p. 15491–6, 17 out. 2006.

DESCH, A. et al. Highly invasive melanoma cells activate the vascular endothelium via an MMP-2/integrin $\alpha\beta 5$ -induced secretion of VEGF-A. **The American journal of pathology**, v. 181, n. 2, p. 693–705, ago. 2012.

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

DIMITRA BOURBOULIA, P. AND W. G. S.-S. Matrix MetalloProteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of MetalloProteinases (TIMPs): positive and negative regulators in tumor cell adhesion. v. 20, n. 3, p. 161–168, 2011.

DREVS, J. VEGF and angiogenesis: implications for breast cancer therapy. **European Journal of Cancer Supplements**, v. 6, n. 6, p. 7–13, mar. 2008.

EBLE, J. A. Matrix biology meets toxinology. **Matrix biology journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 29, n. 4, p. 239–247, 2010.

FELLER, J. K.; MAHALINGAM, M. C-Myc and Cutaneous Vascular Neoplasms. **The American Journal of dermatopathology**, v. 35, n. 3, p. 364–9, maio. 2013.

FERRARA, N. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 21, n. 1, p. 21–6, fev. 2010.

FERREIRA, S. H. University discoveries and intellectual property rights: from Bothrops jararaca bradykinin potentiating peptides to angiotensin converting enzyme inhibitors. **Brazilian journal of medical and biological research Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas Sociedade Brasileira de Biofisica et al**, v. 27, n. 8, p. 1693–1698, 1994.

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

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **Journal of proteomics**, v. 72, n. 2, p. 200–9, 6 mar. 2009.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 5, p. 362–74, maio. 2003.

FULLÁR, A. et al. Tumor cell and carcinoma-associated fibroblast interaction regulates matrix metalloproteinases and their inhibitors in oral squamous cell carcinoma. **Experimental cell research**, v. 318, n. 13, p. 1517–27, 1 ago. 2012.

GEBHARDT, A. et al. Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1. **The Journal of Cell Biology**, v. 172, n. 1, p. 139–149, 2006.

GEIGER, T. R.; PEEPER, D. S. Metastasis mechanisms. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1796, n. 2, p. 293–308, dez. 2009.

GIALELI, C.; THEOCHARIS, A. D.; KARAMANOS, N. K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. **The FEBS journal**, v. 278, n. 1, p. 16–27, jan. 2011.

GOMES, F. G. et al. Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms. **Life sciences**, v. 92, n. 2, p. 101–7, 7 fev. 2013.

GONZÁLEZ-ARRIAGA, P. et al. Genetic polymorphisms in MMP 2, 9 and 3 genes modify lung cancer risk and survival. **BMC cancer**, v. 12, p. 121, jan. 2012.

GOULD, R. J. et al. Desintegrins. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 195, n. 2, p. 168–171, 1990.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011.

HARRIS, A. L. Angiogenesis as a new target for cancer control. **European Journal of Cancer Supplements**, v. 1, n. 2, p. 1–12, set. 2003.

HIGUCHI, D. A et al. Leucurogin, a new recombinant disintegrin cloned from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) with potent activity upon platelet aggregation and tumor growth. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 58, n. 1, p. 123–9, jul. 2011.

HU, M.; POLYAK, K. Microenvironmental regulation of cancer development. **Current opinion in genetics development**, v. 18, n. 1, p. 27–34, 2008.

HUANG, D. X. et al. **Defibrase, a purified fibrinolytic protease from snake venom in acute myocardial infarction.** *Acta Cardiologica*. [s.l: s.n.].

HYNES, R. O. Integrins: a family of cell surface receptors. **Cell**, v. 48, n. 4, p. 549–54, 27 fev. 1987.

HYNES, R. O. Integrins: Bidirectional , Allosteric Signaling Machines In their roles as major adhesion receptors , integrins. v. 110, n. Table 1, p. 673–687, 2002.

JOHANNA A. JOYCE AND JEFFREY W. POLLARD. Microenvironmental regulation of metastasis. v. 9, n. 4, p. 239–252, 2012.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 5, p. 392–401, 2006.

KANDASWAMY, K. K. et al. EcmPred: Prediction of Extracellular Matrix Proteins based on Random Forest with Maximum Relevance Minimum Redundancy Feature Selection. **Journal of theoretical biology**, p. 1–7, 2012.

KAUR, B.; CRIPE, T. P.; CHIOCCA, E. A. “Buy one get one free”: armed viruses for the treatment of cancer cells and their microenvironment. **Current Gene Therapy**, v. 9, n. 5, p. 341–355, 2009.

KESSENBROCK KAI, P. V. AND W. Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. v. 141, n. 1, p. 52–67, 2011.

KIM, D. S. et al. Saxatilin, a snake venom disintegrin, suppresses TNF- α -induced ovarian cancer cell invasion. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 2, p. 290–294, 2007.

KLEIN, T.; BISCHOFF, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. **Amino acids**, v. 41, n. 2, p. 271–90, jul. 2011.

- KO, H. S. et al. Piceatannol Suppresses Breast Cancer Cell Invasion through the. 2012.
- KOH, C. Y.; KINI, R. M. From snake venom toxins to therapeutics--cardiovascular examples. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 59, n. 4, p. 497–506, 15 mar. 2012.
- KRAMER, N. et al. In vitro cell migration and invasion assays. **Mutation research**, v. 752, n. 1, p. 10–24, 2013.
- KRYCZKA, J. et al. Matrix metalloproteinase-2 cleavage of the β 1 integrin ectodomain facilitates colon cancer cell motility. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 43, p. 36556–66, 19 out. 2012.
- LIMAM, I. et al. Leberagin-C, A disintegrin-like/cysteine-rich protein from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, inhibits α v β 3 integrin-mediated cell adhesion. **Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 29, n. 2, p. 117–26, mar. 2010.
- LIN, E. et al. The disintegrin contortrostatin in combination with docetaxel is a potent inhibitor of prostate cancer in vitro and in vivo. **The Prostate**, v. 70, n. 12, p. 1359–1370, 2010.
- LIU, H. et al. MYC suppresses cancer metastasis by direct transcriptional silencing of α v and β 3 integrin subunits. **Nature cell biology**, v. 14, n. 6, p. 567–74, jun. 2012.
- LIU, J. W. et al. Purification, characterization, and cDNA sequence of halysetin, a disintegrin-like/cysteine-rich protein from the venom of *Agkistrodon halys* Pallas. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 278, n. 1, p. 112–118, 2000.
- LUCENA, S. E. et al. Anti-invasive and anti-adhesive activities of a recombinant disintegrin, r-*viridistatin 2*, derived from the Prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 60, n. 1, p. 31–9, jul. 2012.
- MAKRILIA, N. et al. The role of angiogenesis in solid tumours: an overview. **European journal of internal medicine**, v. 20, n. 7, p. 663–71, nov. 2009.
- MARCINKIEWICZ, C. Applications of snake venom components to modulate integrin activities in cell-matrix interactions. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, n. 9, p. 1974–86, set. 2013.
- MARIANO-OLIVEIRA, A. et al. Alternagin-C, a nonRGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 24, p. 4799–4808, 18 nov. 2003.
- MAS-MORUNO, C.; RECHENMACHER, F.; KESSLER, H. Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. **Anticancer agents in medicinal chemistry**, v. 10, n. 10, p. 753–768, 2010.

MONTENEGRO, C. F. et al. Blocking $\alpha v \beta 3$ integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. **Biochimie**, v. 94, n. 8, p. 1812–20, ago. 2012.

MUNIZ, J. R. C. et al. The three-dimensional structure of bothropasin, the main hemorrhagic factor from Bothrops jararaca venom: insights for a new classification of snake venom metalloprotease subgroups. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 52, n. 7, p. 807–16, 1 dez. 2008.

NGUYEN, D. X.; BOS, P. D.; MASSAGUÉ, J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 4, p. 274–84, abr. 2009.

NIE, Z. et al. c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. **Cell**, v. 151, n. 1, p. 68–79, 28 set. 2012.

NISTICÒ, P.; BISSELL, M. J.; RADISKY, D. C. Epithelial-mesenchymal transition: general principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 2, fev. 2012.

OPPENHEIMER, S. B. Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances. **Acta histochemica**, v. 108, n. 5, p. 327–34, jan. 2006.

PATHAK, A.; KUMAR, S. Biophysical regulation of tumor cell invasion: moving beyond matrix stiffness. **Integrative biology quantitative biosciences from nano to macro**, v. 3, n. 4, p. 267–78, 2011.

PHILLIPS, D. R.; SCARBOROUGH, R. M. Clinical pharmacology of eptifibatide. **The American Journal of Cardiology**, v. 80, n. 4A, p. 11B–20B, 1997.

POLYAK, K.; HU, M. Do myoepithelial cells hold the key for breast tumor progression? **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 10, n. 3, p. 231–247, 2005.

RAICA, M.; CIMPEAN, A. M.; RIBATTI, D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. **European journal of cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 45, n. 11, p. 1924–34, jul. 2009.

RAMIREZ, N. E. et al. The $\alpha 2 \beta 1$ integrin is a metastasis suppressor in mouse models and human cancer. v. 121, n. 1, 2011.

RAMOS, O. H. P. et al. Modulation of in vitro and in vivo angiogenesis by alternagin-C, a disintegrin-like protein from Bothrops alternatus snake venom and by a peptide derived from its sequence. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 461, n. 1, p. 1–6, 1 maio. 2007.

RAMOS, O. H. P. et al. A novel $\alpha(v)\beta(3)$ -blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. **Clinical & experimental metastasis**, v. 25, n. 1, p. 53–64, jan. 2008.

RASMUSSEN, S.; HUSTED, S. E. Tirofiban (Aggrastat). A non-peptide glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitor. **Ugeskrift For Laeger**, v. 163, n. 4, p. 461–465, 2001.

REYNOLDS, A. R. Potential relevance of bell-shaped and u-shaped dose-responses for the therapeutic targeting of angiogenesis in cancer. **Doserresponse a publication of International Hormesis Society**, v. 8, n. 3, p. 253–284, 2010.

RICHARDS, D. M.; HETTINGER, J.; FEUERER, M. Monocytes and Macrophages in Cancer: Development and Functions. **Cancer microenvironment official journal of the International Cancer Microenvironment Society**, 2012.

ROH, M. R. et al. Differential expression patterns of MMPs and their role in the invasion of epithelial premalignant tumors and invasive cutaneous squamous cell carcinoma. **Experimental and molecular pathology**, v. 92, n. 2, p. 236–42, abr. 2012.

RØRTH, P. Whence directionality: guidance mechanisms in solitary and collective cell migration. **Developmental cell**, v. 20, n. 1, p. 9–18, 18 jan. 2011.

SAHARINEN, P. et al. VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis. **Trends in molecular medicine**, v. 17, n. 7, p. 347–362, 2011.

SCHMIDT, S.; FRIEDL, P. Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. **Cell and tissue research**, v. 339, n. 1, p. 83–92, jan. 2010.

SCHONI, R. The use of snake venom-derived compounds for new functional diagnostic test kits in the field of haemostasis. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 34, n. 4-5, p. 234–240, 2005.

SCHULTZ, G. S.; WYSOCKI, A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. **Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 17, n. 2, p. 153–62, 2009.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. et al. Alternagin-C, a disintegrin-like protein from the venom of *Bothrops alternatus*, modulates $\alpha 2\beta 1$ integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 38, n. 10, p. 1505–11, out. 2005.

SFILIGOI, C. et al. Angiopoietin-2 expression in breast cancer correlates with lymph node invasion and short survival. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 103, n. 4, p. 466–74, 10 fev. 2003.

SHATTIL, S. J.; KIM, C.; GINSBERG, M. H. The final steps of integrin activation: the end game. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 11, n. 4, p. 288–300, abr. 2010.

SHIN, S.; WOLGAMOTT, L.; YOON, S.-O. Integrin trafficking and tumor progression. **International journal of cell biology**, v. 2012, p. 516789, jan. 2012.

SOUZA, D. H. et al. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 384, n. 2, p. 341–50, 15 dez. 2000.

STANISZEWSKA, I. et al. Effect of VP12 and viperistatin on inhibition of collagen-receptor-dependent melanoma metastasis. **Cancer biology therapy**, v. 8, n. 15, p. 1507–1516, 2009.

STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. Europe PMC Funders Group. v. 458, n. 7239, p. 719–724, 2010.

TAKAHASHI, H.; SHIBUYA, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. **Clinical science (London, England: 1979)**, v. 109, n. 3, p. 227–41, set. 2005.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1824, n. 1, p. 164–76, jan. 2012.

TANJONI, I. et al. Different regions of the class P-III snake venom metalloproteinase jararhagin are involved in binding to alpha2beta1 integrin and collagen. **Toxicon official journal of the International Society on Toxinology**, v. 55, n. 6, p. 1093–1099, 2010.

TEKLEMARIAM, T. et al. Functional analysis of a recombinant PIII-SVMP, GST-acocostatin; an apoptotic inducer of HUVEC and HeLa, but not SK-Mel-28 cells. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 57, n. 5, p. 646–56, abr. 2011.

USAMI, Y. et al. A 28 kDa-protein with disintegrin-like structure (jararhagin-C) purified from Bothrops jararaca venom inhibits collagen- and ADP-induced platelet aggregation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 201, n. 1, p. 331–339, 1994.

VYAS, V. K. et al. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, n. 2, p. 156–62, fev. 2013.

WERB, Z. E11. The tumour microenvironment in breast cancer. **European Journal of Cancer**, v. 48, p. S24–S25, mar. 2012.

WOLF, K. et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. **The Journal of cell biology**, v. 160, n. 2, p. 267–77, 20 jan. 2003.

WOLF, K.; FRIEDL, P. Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. **Trends in cell biology**, v. 21, n. 12, p. 736–44, dez. 2011.

WORD HEALTH ORGANIZATION. Global Health and Aging. [s.d.].

YANG, R.-S. et al. Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 5, p. 661–9, abr. 2005.

YILMAZ, M.; CHRISTOFORI, G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. **Molecular cancer research MCR**, v. 8, n. 5, p. 629–642, 2010.

YILMAZ, M.; CHRISTOFORI, G.; LEHEMBRE, F. Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. **Trends in molecular medicine**, v. 13, n. 12, p. 535–41, dez. 2007.

YUE, J.; ZHANG, K.; CHEN, J. Role of integrins in regulating proteases to mediate extracellular matrix remodeling. **Cancer microenvironment: official journal of the International Cancer Microenvironment Society**, v. 5, n. 3, p. 275–83, dez. 2012.

ZHANG, Z. et al. alpha2beta1 integrin expression in the tumor microenvironment enhances tumor angiogenesis in a tumor cell-specific manner. **Blood**, v. 111, n. 4, p. 1980–1988, 2008.

ZIGRINO, P. et al. The reprotolysin jararhagin, a snake venom metalloproteinase, functions as a fibrillar collagen agonist involved in fibroblast cell adhesion and signaling. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 43, p. 40528–35, 25 out. 2002.

4. CAPÍTULO I: PADRONIZAÇÃO DA CLONAGEM DA ALTERNAGINA-C

4.1 METODOLOGIA

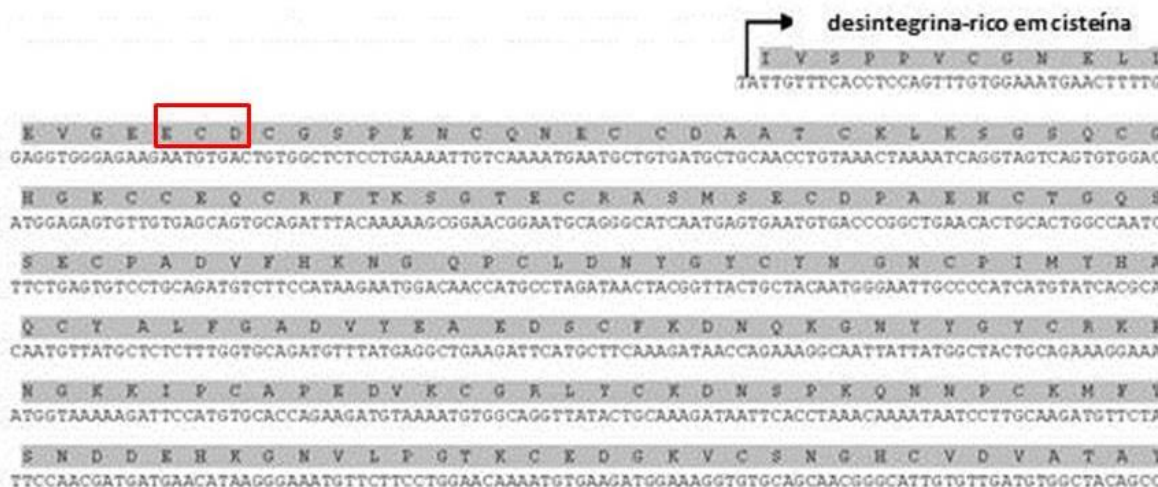
4.1.1 OBTENÇÃO DA ALTERNAGINA-C RECOMBINANTE

O cDNA que codifica a ALT-C, foi obtido de uma biblioteca de cDNA construída a partir da glândula venenifera de *Rhinocerophis alternatus* em nosso laboratório (HIRAYAMA, 2011, dados não publicados). Foram usadas ferramentas de bioinformática (MULTIALIN e CAP3) e a sequência de nucleotídeos foi alinhada e comparada as seqüências do banco de dados National Center for Biotechnology Information através do BLAST (Basic Local Alignment Tool) disponível no site do NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

4.1.2 CLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO

Para a clonagem da ALT-C foram desenhados primers baseados no sequenciamento do cDNA da ALT-C obtido da biblioteca (Hirayama, 2011, dados não publicados) (figura 11).

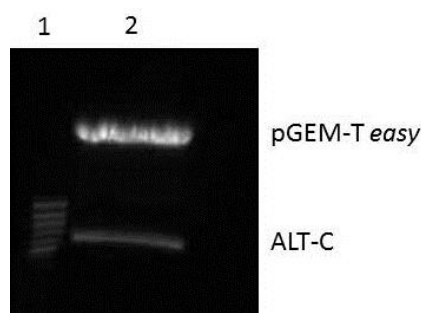
Figura 11: Sequência codificadora da ALT-C originada da biblioteca de cDNA (modificado de Hirayma, 2011, dados não publicados).



Os primers foram desenhados com sítios de restrição *Xho* I e *Bam* HI em destaque: primer *forward*: 5' CGCGGATCCATTGTTTCACCTCCAGTT 3' e primer *reverse*: 5' CTGCTCGAGTCAGTAGGCTGTAGCCACATC 3'. A PCR foi realizada utilizando 35 ciclos de 95 °C (45 segundos), 65 °C (45 segundos) e 72 °C (1 minuto). O produto de PCR foi extraído através de gel de agarose a 1% e para uma eficiente ligação ao vetor de clonagem pGEM-T *easy* (Promega), esse produto foi submetido a uma reação de adenilação que consiste na introdução *in vitro* de uma adenina (A) na extremidade 3' terminal desse produto de PCR. O sistema pGEM-T *easy* contém um plasmídeo linear que possui uma timina (T) em cada uma de suas extremidades 3' e que permite a inserção dos produtos de PCR adenilados pela enzima T4 DNA ligase. A ligação do inserto no sítio de clonagem do vetor localizado dentro do gene *lac z*, interrompe a produção da enzima β -galactosidase. Células bacterianas construídas dessa maneira, não produzem a β -galactosidase e são identificadas em meio seletivo (meio de cultura contendo antibiótico específico ampicilina, IPTG e X-GAL) por apresentarem coloração branca. A transformação das células *E. coli* DH5 α foi feita usando 50 μ L de células competentes misturadas à reação de ligação em tubo estéril e incubadas no gelo por

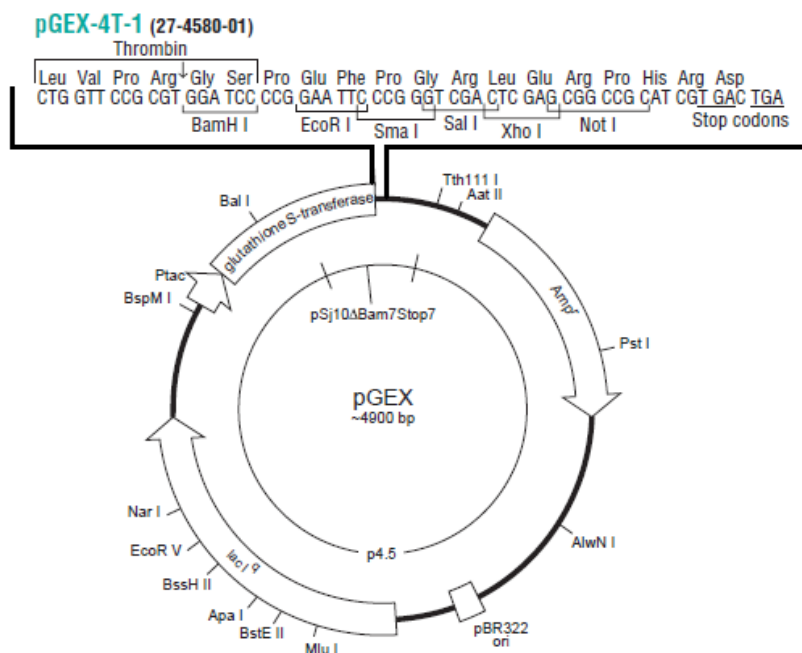
30min. Após este período foi dado o choque térmico de 2 min a 42°C seguido de 2min no gelo e posterior adição de 1mL de meio LB (Luria-Bertani) líquido e a mistura levada para incubadora a 37°C sob leve agitação por cerca de 1 hora. Uma alíquota de 30µL do volume total da reação foi plaqueada em meio seletivo (LB-ágar, ampicilina 100ug/mL, IPTG 1mM, X-GAL 100ug/mL) e incubada *overnight* a 37°C. Das colônias brancas que cresceram em meio seletivo, 6 foram selecionadas e cultivadas em meio LB líquido contendo ampicilina (100ug/mL) para posterior extração do DNA plasmidial e confirmação da clonagem em vetor pGEM-T *easy* (Figura 12).

Figura 12: Confirmação da clonagem em vetor pGEM-T *easy*. Reação de digestão com as enzimas *Bam* HI e *Xho* I onde: 1-Marcador Molecular (Low DNA Mass Ladder - Invitrogen), 2- Vetor pGEM-T *easy* tratado com enzimas de restrição *Bam* HI e *Xho* I mostrando a liberação do inserto correspondente a ALT-C. Gel de agarose 1%.



Para gerar proteínas de fusão com GST, o inserto da ALT-C clonado no vetor pGEM-T *easy* foi isolado com as enzimas *Bam* HI e *Xho* I e clonado em vetor pGEX-4T1. Este vetor possui como peculiaridade que é a possibilidade de expressar a proteína de interesse em fusão com a GST (glutathione-S-transferase) permitindo a purificação por sua elevada afinidade a glutathione. Possui ainda um sítio de clivagem para trombina que permite a separação da proteína de fusão após a purificação (Figura 13).

Figura 13: Mapa do vetor pGEX4T-1 em fusão com GST (glutathione S-transferase) GE HealthCare.



4.1.3 DIGESTÃO E LIGAÇÃO

A partir da reação de digestão com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Xho* I foi obtido o fragmento da ALT-C clonado em vetor pGEMe-T. O DNA do vetor pGEX-4T-1 também foi submetido a esse tratamento enzimático para a inserção dos sítios de restrição. Alíquotas foram analisadas em gel de agarose 1%, os fragmentos de DNA foram extraídos e purificados com o *Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) conforme as especificações do fabricante. O DNA plasmidial do vetor pGEX-4T-1 e do fragmento referente a ALT-C foram submetidos a reação de ligação (proporção molar de 1:3, respectivamente) mantida a 4°C *overnight*, utilizando 1U da enzima T4 DNA Ligase (Promega). O fragmento referente a ALT-C foi colocado em excesso de modo a obter uma maior eficiência da reação.

4.1.4 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES

Para obtenção de células competentes foi realizado um inóculo a partir de um estoque de glicerol de *E. coli* DH5a de 5mL crescido *overnight* em incubadora a 37°C a 250rpm. Foi realizada uma diluição de 1:100 até que a cultura atingisse uma D.O._{600nm} entre 0,6 e 0,8. As células foram alíquotadas em 4 tubos de 1,5mL cada e centrifugadas (3000rpm; 5min, 4°C). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas, gentilmente, em 500µL de uma solução de CaCl₂ (50mM) e incubadas no gelo por 30min. Uma nova centrifugação foi feita (3000rpm; 10min; 4°C) e as células foram ressuspendidas em 200µL da mesma solução de CaCl₂ e utilizadas após 24 horas estocadas a 4 °C.

4.1.5 TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO

Para transformação das células foram utilizados 50µL de células competentes, misturadas à reação de ligação em tubo estéril e incubadas no gelo por 30min. Após este período foi dado o choque térmico de 2 min a 42°C seguido de 2min no gelo e posterior adição de 1mL de meio LB. Após o choque as células foram levadas para incubadora a 37°C sob leve agitação por cerca de 1 hora para permitir a expressão do marcador de seleção. Uma alíquota de 50µL do volume total da reação foi plaqueada em meio seletivo e incubada *overnight* a 37°C. A confirmação das células *E. coli* recombinantes foi realizada pela extração de seu DNA plasmidial e sua utilização como molde em PCR com os primers utilizados para clonagem. O clone então foi transformado em linhagens diferentes de *E. coli*, AD494(DE3) e ptGROE para verificar se haveria diferenças nos padrões de expressão.

4.1.6 TESTE DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA

Linhagens de *E. coli* AD494(DE3) e ptGROE recombinante foram cultivadas *overnight* a 37°C sob agitação (250rpm) em meio contendo antibiótico adequado, e na

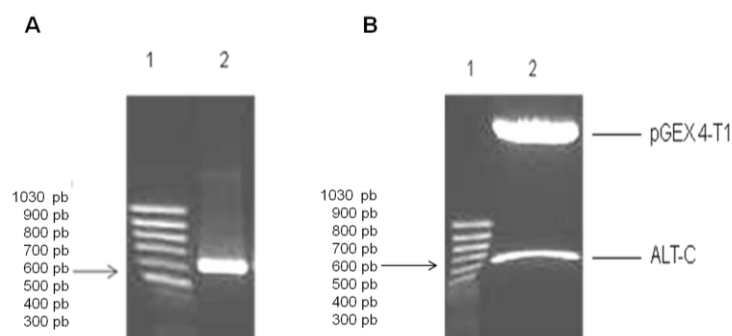
manhã seguinte, sofreram uma diluição de 1:100 até a fase log de crescimento ($D.O._{600nm} = 0,4 - 0,6$). A expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG 1mM (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo) concentração final, por 3 horas a $37^\circ C$ sob agitação de 250rpm. O acompanhamento da expressão foi realizado com retirada de amostras no tempo zero e 3 horas após a indução. Cada uma das alíquotas de 1mL foi centrifugada (13.000 rpm; 1min) e ressuspendida em H_2O Milli-Q e tampão β -mercaptoetanol a uma razão de 2:1. As amostras foram analisadas em SDS-PAGE 15% sob condições desnaturantes a 80V por aproximadamente 3 horas e coradas com solução corante (Comassie Brilliant Blue R 0,25%, ácido acético 10%, metanol 50%) e descoradas com solução descorante (ácido acético 10% e metanol 10%).

4.2 RESULTADOS

4.2.1 CLONAGEM E EXPRESSÃO

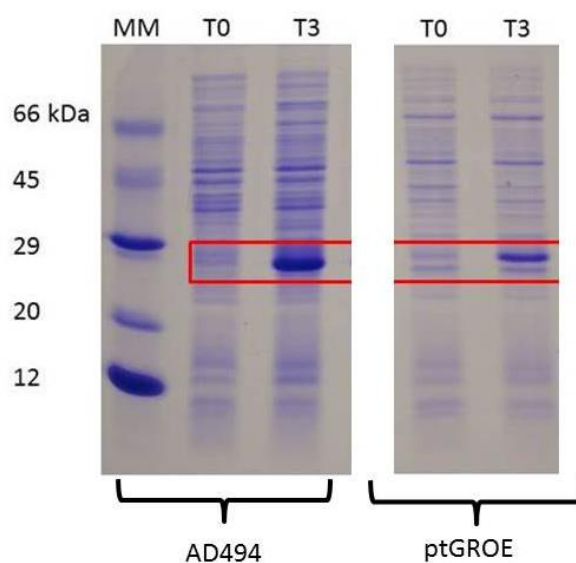
Para confirmação da clonagem do cDNA da ALT-C, foi realizada a extração do DNA plasmidial do clone e sua utilização como molde na PCR. O clone amplificou um fragmento de aproximadamente 636pb como esperado (Figura 14).

FIGURA 14: Confirmação da clonagem em vetor pGEX-4T-1. (A) 1-Marcador Molecular (*Low DNA Mass Ladder* - Invitrogen), 2- Produto de PCR da ALT-C de aproximadamente 636pb). Gel de agarose 1%. (B) Reação com enzimas de restrição *Bam* HI e *Xho* I. 1-Marcador Molecular (*Low DNA Mass Ladder* - Invitrogen), 2- Vetor pGEX-4T1 tratado com enzimas de restrição *Bam* HI e *Xho* I mostrando a liberação do inserto correspondente a ALT-C. Gel de agarose 1%.



O gel de poliacrilamida 15% SDS-PAGE confirmou que **não** houve a expressão da proteína recombinante, apesar das diversas tentativas, variando-se as condições de cultivo. O gel mostra somente a expressão da banda referente a GST, 26 kDa (Figura: 15).

FIGURA 15: Teste de expressão. Gel de poliacrilamida 15% SDS-PAGE confirmando que a ALT-C recombinante **não** foi expressa. MM: Marcador Molecular (*Bench Marker Protein Ladder*-Invitrogen), T0: alíquota da cultura antes da indução com IPTG, T3: alíquotada cultura depois da indução com IPTG mostrando a banda referente a GST, 26 kDa.



4.3 CONCLUSÃO

A ALT-C foi clonada em vetor pGEX-4T1 mas não houve a expressão da proteína em sistema procarioto (*E.coli*). Provavelmente a ineficiência da expressão pode ter acontecido por características estruturais da sequência de nucleotídeos do cDNA. É sugerida uma reanálise mais profunda da sequência nucleotídica do gene alvo para clonagem em novos sistemas.

5. CAPÍTULO II: MANUSCRITO

Different cell responses to alternagin-C, an $\alpha_2\beta_1$ integrin-binding disintegrin, of fibroblasts, tumor breast and endothelial cells in vitro

Lívia Mara Santos^a, Tamires de Castro Vieira^a, Heloísa Sobreiro Selistre-de-Araújo^{a*}

^a Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luis, Km 235, São Carlos, SP, 13565-905, Brazil

*Corresponding author. Tel.: +55 16 33518333; fax: +55 16 33518409

E-mail address: hсараујо@power.ufscar.br (H.S. Selistre-de-Araujo).

Abbreviations: ALT-C, alternagin-C; ECM, extracellular matrix; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; MMP-2, matrix metalloproteinase 2; MMP-9, matrix metalloproteinase 9; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; VEGF, vascular endothelial growth factor; ECD, Glutamic acid - Cysteine - aspartic acid, ANG-2, angiopoetin-2.

ABSTRACT

Matrix metalloproteinases (MMPs) are key players in tumor progression since they help tumor cells to modify the extracellular matrix and to release cytokines and growth factors. MMPs can be activated by cell-surface molecules such as the integrins, major adhesion receptors of cell surface. Strong inhibitors of these receptors were found in snake venoms, and named disintegrins. Alternagin-C (Alt-C), a disintegrin from *Rhinocerothis alternatus* snake venom, has strong affinity for $\alpha_2\beta_1$ integrin and therefore it modulates cell adhesion, migration and proliferation, but there is no study of ALT-C effect on MMP activity. Here, we show that ALT-C increased MDA-MB-231 cell migration in low concentration (10 nM) but it decreased cell migration in higher concentrations (40, 100 and 1000 nM). ALT-C inhibited MMP-9 activity in human breast cancer (MDA-MB-231) conditioned medium and MMP-2 activity in fibroblasts and human micro vascular endothelial cells (HMEC-1) conditioned medium. ALT-C also modulated the expression of angiogenic genes such as VEGF, c-MYC, MMP-2 and MMP-9. ALT-C also was able to inhibit transendothelial migration of MDA-MB-231 cells (10, 40, 100 and 1000 nM). In conclusion, these results suggest that $\alpha_2\beta_1$ integrin binding by ALT-C may induce distinct effects in different cell lines by modulating MMP activity and stimulating the expression of angiogenic factors that influence tumor progression. These results may be very useful for medical and biotechnological applications in development of anti-angiogenic and anti-metastatic therapies.

Keywords: ALT-C, $\alpha_2\beta_1$ integrin, cancer, tumor microenvironment, MMP, VEGF

1. INTRODUCTION

Cancer is a public health problem, being estimated 27 million new cases worldwide until 2030 (World Health Organization, 2011). One of the crucial features in the process of tumor development is the modulation of cell adhesion and migration abilities that lead to metastasis (Brooks et al., 2010).

Metastasis is a complex process that consists in invasion, transmigration, survival in the circulation, extravasation and colonization (Geiger and Peeper, 2009). For decades, scientists have studied the development and tumor progression and observed that normal cells residing in the vicinity of the tumor that plays a fundamental role in tumorigenesis (Nguyen et al., 2009). The tumor stroma consists mainly of fibroblasts, extracellular matrix (ECM) components, vasculature, inflammatory cells and mesenchymal stem cells that in concert with tumor cells, further remodel the microenvironment by secreting growth factors, angiopoietins (ANG), proteases, chemokines and other angiogenic components (Buchanan et al., 2012; Gomes et al., 2013). VEGF-A is the main factor that mediates angiogenesis by binding to its receptors, mainly VEGFR-1 and VEGFR-2. VEGF-A can be produced by tumor cells and the tumor microenvironment cells such as fibroblasts and is a potent regulator of angiogenesis in both physiological and pathological processes (Dreys, 2008; Gomes et al., 2013). Angiopoietins play an important role in vessel maintenance, growth and stabilization. ANG-2 has been found to be implicated in tumor-associated angiogenesis and tumor progression since it is increased during vascular remodeling by binding to the Tie receptor (Makrilia et al., 2009). It has been found that VEGF also activates the Tie2 receptor. This receptor takes part in vessel maturation by mediating survival signals for endothelial cells (Makrilia et al., 2009).

Oncogenes have been shown to be angiogenesis regulators. c-MYC is a proto-oncogene that is involved in various cellular processes, including cell growth, proliferation and apoptosis (Feller and Mahalingam, 2013). Studies demonstrated that the requirement of c-MYC for the expression of other angiogenic related factors such as angiopoietin-1, angiopoietin-2, thrombospondin-1 and VEGF-A (Brandvold et al., 2000; Baudino et al., 2002).

The ECM is involved in signal transduction by cell adhesion receptors such as the integrins (Schmidt and Friedl, 2010). Integrins are a family of cell adhesion heterodimeric transmembrane receptors (Hynes, 2002) and the profile of these molecules may vary rapidly according to the environment (Shin et al., 2012). Integrins can be activated by metalloproteases triggering a signaling cascade that activates the endothelium, an essential step for the adhesion of tumor cells (Desch et al., 2012).

Some evidence supports the view that matrix metalloproteases (MMPs) induce changes in the microenvironment during tumor progression by inducing extracellular matrix remodeling and release of cytokines and growth factors (González-Arriaga et al., 2012). The overexpression of MMP-2 and MMP-9 is well established in various types of cancer, such colorectal tumors (Kryczka et al., 2012), melanoma (Desch et al., 2012) and breast cancer (Ko et al., 2012) and it has been significantly associated with tumor progression and decreased survival (Roh et al., 2012).

Disintegrins are small proteins from snake venoms that potently inhibit integrin functions (Marcinkiewicz, 2013). The following proteins have previously shown strong efficacy in the inhibition of adhesion, migration, invasion and/or angiogenesis of different tumor cell lines *in vitro* and *in vivo*: disba-01 (Montenegro et al., 2012), contortrostatin (Lin et al., 2010), r-mojastin 1 (Lucena et al., 2012), acocostatin

(Teklemariam et al., 2011) , rubistatin (Carey et al., 2012) , viperistatin (Staniszewska et al., 2009) and rhodostomin (Yang et al., 2005).

Alternagin-C, an ECD-disintegrin, has shown to be a potent inhibitor of collagen- induced adhesion by blockage of $\alpha_2\beta_1$ integrin (Souza et al., 2000; Selistre-de-Araujo et al., 2005). Previous studies have shown that ALT-C inhibited mouse fibroblast adhesion to collagen I to $\alpha_2\beta_1$ integrin and various tumor cell lines (Cominetti et al., 2004). No study was done to determine the influence of ALT-C on MMPs activity in tumor and normal cells. Here, we provide further evidence that ALT-C inhibits MMP-9 activity in human breast cancer (MDA-MB-231) conditioned medium and MMP-2 activity in fibroblasts and human microvascular endothelial cells (HMEC-1) conditioned medium. ALT-C also was able to modulate the angiogenic genes expression as VEGF, c-MYC, MMP-2 and MMP-9. These results add new information on the role of $\alpha_2\beta_1$ integrin in the tumor microenvironment.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Purification of Alternagin-C

ALT-C was purified from *R. alternatus* crude venom by two steps of gel filtration followed by anion exchange chromatography as previously described (Souza et al., 2000).

2.2. Cell lines and culture

Human fibroblasts were purchased from the Cell Bank of Rio de Janeiro (Brazil). Human breast tumor cell line (MDA-MB-231) was from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Both cell lines were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Vitrocell, Campinas; SP; Brazil)

supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS). Microvascular endothelial HMEC-1 was cultured in MCDB-131 (Sigma) with 10% FBS. All cell lines were cultured in the presence of penicillin (100 IU/mL), streptomycin (100 μ g/mL) and L-glutamine (2 mM), in a humidified environment with 5% CO₂ at 37°C. For all cell assays, the cells were harvested with 0.25 % trypsin-0.1% EDTA solution. MDA-MB-231 cells were used at passage 28, human fibroblasts at passage 25 and HMEC-1 cells at passage 10.

2.3. Flow cytometry analysis

The integrin content of the cells was determined using specific anti-integrin antibody by flow cytometry. Brief, 1x 10⁶ cells were incubated with 1 μ g of anti-integrin at 4°C for 30 min. After, the cells were washed with PBS and centrifuged at 4°C for 10 min at 150 x g. Then, 0.5 μ g of FITC-IgG was added to each sample and incubated for 30 min at 4°C in the dark. At the end of this time, cells were washed again with PBS, centrifuged and immediately analyzed in a FACs Calibur flow cytometer (BD Bioscience).

2.4. Wound healing assay

Wound healing migration assay is the repopulation of wounded cultures. The cells were seeded into 12-well culture plates at 1 \times 10⁵ cells/well and cultured in medium containing 10% FBS to near confluence of the cell monolayer. The monolayers were carefully wounded using a yellow pipette tip, and any cellular debris present was removed by washing with medium. The wounded monolayers were then incubated for 24 h in serum-free medium (SFM) containing 10, 40, 100 and 1000 nM of ALT-C.

2.5. Image capture and data analysis

Images at time zero ($t = 0$ h) were captured to record the initial area of the wounds, and the recovery of the wounded monolayers due to cell migration toward the denuded area was evaluated at 24 h ($t = \Delta$ h). The images were captured using an inverted microscope (Olympus CK2 ULWCD 0.30; 10 \times objective) equipped with a digital camera (Cool SNAP-Pro Color with Image Pro software). The area of wound was quantified by Java's Image J software (<http://rsb.info.nih.gov>) using the polygon selection mode. The migration of cells toward the wounds was expressed as percentage of wound closure: % of wound closure = $[(A_{t=0\text{ h}} - A_{t=\Delta\text{ h}})/A_{t=0\text{ h}}] \times 100\%$, where, $A_{t=0\text{ h}}$ is the area of wound measured immediately after scratching, and $A_{t=\Delta\text{ h}}$ is the area of wound measured 24 h after scratching.

2.6. Gelatin zymography

MMP activity was analyzed by the gelatin zymography. Cells (1×10^5) were seeded in 12 well plates, grown at 37°C until confluence and scratched with a 200 μ l plastic tip. Confluent monolayers were washed once with the appropriate medium to remove cell debris, and medium without serum and with different ALT-C concentrations was added to the wells. After the treatment, culture medium was collected, centrifuged at 10,000 \times g for 5 min at 4°C and incubated with sample buffer without β -mercaptoethanol. The samples were resolved in a 10% polyacrylamide gel containing 0.1% gelatin at 4 °C. The gel was washed 2 times with 2.5% Triton X-100 and incubated at 37 °C during 18 h in 50 mM Tris buffer pH 8.0, 5 mM CaCl_2 , 0.02% NaN_3 and 10 mM ZnCl_2 . After staining with Commassie Blue R-250 and destaining with acetic acid:methanol:water (1:4:5), the clear bands were quantified by densitometry using the Image J software. MMP-2 and MMP-9 were quantified as arbitrary units using GraphPad Prism 5.0 software.

2.7. Isolation of total RNA and synthesis of cDNA

Cells in culture medium (DMEM or MCDB-131) plus 10% FBS were incubated in 6 cm dishes (Corning) for 48 hours at 37 °C and 5% CO₂. The cells were then incubated with 10, 100 or 1000 nM ALT-C. After incubation of 24 hours, culture medium was removed and the cells were lysed with cold Trizol Reagent (Invitrogen) according to the manufacture's protocol for total RNA isolation. RNA concentrations and purity were determining by the ratio of the absorbance at 260 nm and 280nm in Nanodrop 2000 and RNA integrity was confirmed by inspection of ethidium bromide stained 1% agarose-formaldehyde gel. Total RNA was reverse transcribed into cDNA using the M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). cDNA was stored at 20 °C until use.

2.8. Oligonucleotide primers

Oligonucleotide primers were designed using Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). The primer sequences were: GAPDH forward 5' GATGCTGGTGCTGAGTATGT and reverse 5' GTGGTGCAGGATGCATTGCT, VEGF forward 5'-CACATTGTTGGAAGAAGCAGCCCA and reverse 5' ACTCACACACACACAACCAGGTCT, c-MYC forward 5' CCTACCCTCTCAACGACAGC and reverse 5' CTTGTTCTCCTCAGAGTCGC , MMP-2 forward 5' AGGACCGGTTTCATTGGCGG and reverse 5' TGGCTTGGGGTACCCTCGCT, MMP-9 forward 5' CGCTACCACCTCGAACTTIG and reverse 5' GCCATTCACGTCGTCCTTAT, ANG-2 forward 5-

TCCAAGCAAAATTCCATCATTG-3 and reverse 5-GCCTCCTCCAGCTTCCATGT-3.

2.9. Analysis by quantitative polymerase chain reactions (q PCR)

Detection of mRNA for the different experimental and control samples was performed in a BioRad CFX Manager. The amplification mixes contained 6.25uL of fluorescent dye Eva Green Supermix (BioRad), 0.5 μ L of cDNA, 4.75 μ L of DEPC water, 1 uL (100 μ M/ μ L) of each primer in a final volume of 12,5 μ L. Thermal cycling conditions to all genes included 15 min at 95 °C, 45 cycles each of 30 s at 72 °C and 30 s at 56 °C to GAPDH and VEGF, 59.5 °C to c-MYC, 60 °C to MMP-2, 59 °C to MMP-9 and 60 °C to ANG-2. For each gene, all samples were amplified simultaneously in duplicate in one assay run. Data were analyzed using the comparative cycle threshold (Ct) method. The target gene expression was normalized to GAPDH gene as previously described (Bustin et al., 2009). A blank with no template sample but just water, primers and Eva Green was also performed.

2.10. VEGF enzyme-linked immunoassay

The conditioned medium of treated and untreated (control) cells was used for analysis of VEGF expression by enzyme-linked immunoassay (ELISA). The assays were performed using the Human VEGF ELISA Development Kit (Peprotech) according to the manufacturer's instructions.

2.11. Transendothelial migration assay

This test mimics cell transmigration, one of the crucial steps of metastasis. 1×10^5 HMEC were seeded in inserts with 8 μ m pore (12 wells/plate) (BD Biosciences) and

cultured in medium containing 10% FBS to near confluence of the cell monolayer. MDA-MB-231 cells were stained with CellTrackerRed (Invitrogen), treated with ALT-C and placed in the upper chamber covered with a monolayer of HMEC-1 and incubated for 16 hours at 37 °C and 5% CO₂. The transmigrated cells were fixed with 3.7% formaldehyde and stained with DAPI. Ten randomly chosen fields in the inserts were photographed and counted with a fluorescence microscope (Olympus U-RFL-T, 40 x objective, DP2BSW software).

2. 12. Statistical analysis

Each experiment was repeated twice in triplicate and mean and standard error were calculated. The results were compared statistically using one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test was used when p level were $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

3. RESULTS

3.1. Characterization of integrin cell expression by flow cytometry

We have first analyzed the content of some major integrins in the cell types used in this work by flow cytometry. Our results showed that the cell lines have different profiles of integrins (Fig.1). MDA-MB-231 cells express more than 50% of α_5 , β_1 , and β_4 integrin receptors. Human fibroblasts strongly express α_5 , α_v , β_1 integrins, differently from HMEC-1 cells that express more than 50% of α_5 , α_v , β_1 and β_4 integrins. All cell lines express different levels of α_2 integrin less than 50%. Therefore these cells were considered good models to investigate the role of $\alpha_2 \beta_1$ integrin on MMP activity and cell migration.

3.2. Wounding assay

ALT-C increased MDA-MB-231 cell migration (19%) at lower concentration (10 nM) compared to control (Fig.2 A). No effect was observed on fibroblasts (Fig.2 B) and HMEC-1 migration (Fig. 2 C).

3.3. ALT-C inhibits MMP activity in conditioned medium of cell cultures

MMP activity from conditioned medium from ALT-C-treated cells after a wound healing assay was analyzed by gelatin zymography. ALT-C inhibited about 30% of MMP-9 activity of the MDA-MB-231 cells conditioned medium (Fig. 3 A-B), and MMP-2 activity was not detected. This effect was concentration-independent.

Interestingly, ALT-C 1000 nM inhibited about 25% of MMP-2 activity in the conditioned medium from human fibroblast culture (Fig. 4 A-B). Lower concentrations had no effect. All tested concentrations of ALT-C (10, 40, 100 and 1000 nM) decreased (31.9%; 31.9%; 41.6%; 35.7% respectively) MMP-2 activity in the HMEC-1 cells conditioned medium (Fig. 5 A-B). MMP-9 activity was not detected in the conditioned medium of fibroblasts and HMEC-1.

3.4. ALT-C affects MMP gene expression

MMP-9 expression was strongly inhibited by ALT-C in all tested concentrations (10, 100, 1000 nM) (Fig. 6A). In agreement with the activity in conditioned medium results, ALT-C only at 1000 nM inhibited MMP-2 expression in human fibroblasts (Fig. 6 B), but no significant ALT-C effect was observed in MMP-2 expression in HMEC-1 cells (Fig. 6 C).

3.5. ALT-C modulates VEGF gene expression in MDA-MB-231 cells and human fibroblasts but not in HMEC-1 cells

ALT-C at lower concentrations (10 and 100 nM) increased VEGF expression of MDA-MB-231 cells compared to controls, but at 1000 nM ALT-C inhibited VEGF expression about 3 times compared to 100nM dose (Fig.7A). In human fibroblasts, ALT-C at all concentrations 10, 100 and 1000 nM strongly induced VEGF gene expression, and this effect was more pronounced with 100 nM ALT-C (Fig. 7 B). No significant ALT-C effect was observed in VEGF gene expression in HMEC-1 cells (Fig. 7 C). Surprisingly, VEGF protein levels in MDA-MB-231(Fig. 7 D), human fibroblasts (Fig. 7 E) and HMEC-1 cells (Fig. 7 F), were not significantly altered by ALT-C in any of all used concentrations.

3.6. ALT-C induces c-MYC gene expression in MDA-MB-231 and HMEC-1 cells but not in human fibroblasts

ALT-C (100 and 1000 nM) strongly upregulated c-MYC gene expression in MDA-MB-231 cells, and this effect was more pronounced with 1000 nM ALT-C (Fig.8 A). No significant ALT-C effect was observed in c-MYC gene expression in human fibroblasts (Fig. 8 B). In HMEC-1 cells, ALT-C 1000 nM increased c-MYC gene expression compared to 10 nM (Fig. 8 C).

3.7. ALT-C does not affect ANG-2 gene expression in MDA-MB-231 and HMEC-1 cells

We observed here that ANG-2 gene expression levels in MDA-MB-231 (Fig. 8 D) and HMEC-1(Fig. 8 E) cells were not significantly altered independently of the

concentration of ALT-C (10, 100 and 1000 nM). Angiopoietin-2 was not analyzed in fibroblasts.

3.8. ALT-C inhibits MDA-MB-231 transendothelial migration

ALT-C (10, 40, 100 and 1000 nM) inhibited (33,8%; 18,1%; 32,5% and 40% respectively) tumor cell transmigration through endothelial cells (Fig. 9 A). Tumor cells were labeled with cell tracker to be distinguished from HMEC-1 and all cells were visualized by using DAPI (Fig. 9B).

4. DISCUSSION

Metastasis dissemination depends on the characteristics of the tumor microenvironment which composition may vary with tumor stage and with the interactions among cancer and stromal cells (Joyce & Pollard, 2012). Stromal components may have tumor inhibiting or promoting functions or both depending on the context (Werb, 2012). MMPs are key players in tumor progression due to their ability to modify the extracellular milieu. These proteases are regulated by numerous stimulatory and suppressive factors, such as integrin-derived signals, extracellular matrix proteins, cell stress and changes in cell shape (Gialeli et al., 2011), generating thereby oncogenic and angiogenic signals (Fullár et al., 2012). Metastatic tumors show often deregulated protease activity (Yue et al., 2012). Integrins can promote metastasis by modulating the proteolytic enzymes (Wolf et al., 2003; Wolf & Friedl, 2011; Desch et al., 2012). The collagenous environment triggers $\alpha_2\beta_1$ integrin-mediated intracellular signaling events that will modify gene expression of several proteins including the MMP set (Zigrino et al., 2002). Since ALT-C activates $\alpha_2\beta_1$ integrin (Mariano-Oliveira et al., 2003), we demonstrate here that MMP expression and activation is dependent of

the cell type. Our study shows that ALT-C inhibits the activity and gene expression of MMP-2 (fibroblasts, HMEC-1) and MMP-9 (MDA-MB-231). It was previously demonstrated that saxatilin, a monomeric disintegrin, decreases MMP-9 expression in ovarian cancer cells (Kim et al., 2007).

ALT-C inhibited VEGF expression in MDA-MB-231 cells. VEGF is commonly overexpressed in several types of human cancers (Ferrara, 2010). Accordingly, blocking VEGF alone has been shown significant efficacy in various preclinical tumor models as well as in anti-angiogenic therapy in human cancer patients (Saharinen et al; 2011). Conversely, ALT-C induced VEGF expression in fibroblasts. These results show that ALT-C strongly affects the tumor microenvironment and stromal cells respond differently under disintegrin exposure. Previous studies have demonstrated that ALT-C induced HUVEC proliferation and in vivo angiogenesis (Ramos et al., 2007). Fibroblasts are essential for the maintenance and repair of tissues by producing VEGF and inducing ECM remodeling (Schultz and Wysocki, 2009). VEGF secreted by tumor cells may alone, or in combination with other angiogenic factors, up-regulate $\alpha_2\beta_1$ integrin expression in vivo (Zhang et al., 2008). In turn, the angiogenic response is modulated by $\alpha_2\beta_1$ integrin expression (Zhang et al., 2008).

ALT-C significantly upregulated c-MYC expression in MDA-MB-231 cells, but not in fibroblasts. The expression of c-MYC was increased in HMEC-1 cells only at the ALT-C highest concentration. Under normal conditions, c-MYC is involved in various cellular processes. One of the gene's key biological functions is its ability to control cell growth and proliferation (Nie et al., 2012). Overexpression of c-MYC significantly inhibited migration and reduced invasiveness of MDA-MB-231 in vitro (Liu et al., 2012). c-MYC has been implicated in hematopoiesis and it has been shown to play a crucial role in angiogenesis via vascular endothelial growth factor-dependent

mechanism (Feller and Mahalingam, 2013). c-MYC may be involved in controlling the expression of integrin genes using cells from different tissues (Liu et al., 2012; Gebhardt et al., 2006). To our knowledge, this is the first report of c-MYC upregulation by disintegrin activation of $\alpha_2\beta_1$ integrin. We propose that overexpression c-MYC has led to upregulation of $\alpha_2\beta_1$ integrin. Studies have shown that overexpression of c-MYC (Liu et al., 2012) and $\alpha_2\beta_1$ integrin (Ramirez et al., 2011) reduces invasion and metastasis in MDA-MB-231 breast tumor cells. In prostate carcinoma, $\alpha_2\beta_1$ integrin promotes prostate cancer skeletal metastasis (Sottinik et al., 2013).

Angiopoietins are associated with other angiogenic factors mainly with VEGF-A appear to perform an important role in the formation of new blood vessels that help in tumor progression but their role in tumor microenvironment is not yet elucidated (Sfiligoi et al., 2003; Daly et al., 2006; Saharinen et al., 2011). Here, ALT-C was not able to affect ANG-2 gene expression in MDA-MB-231 and HMEC-1 cells.

ALT-C inhibited MDA-MB-231 transendothelial migration through the endothelial cell layer. This assay is intended to simulate the extravasation of tumor cells from the blood vessels that lead to the establishment of metastasis (Ramirez et al., 2011). Since ALT-C inhibits MMP-9 activity, these results suggest that MDA-MB-231 cells depend on MMP-9 activity to extravasate and form tumor secondary sites.

Cell migration is a critical process of invasion allowing primary tumors to metastasize (Yilmaz and Christofori, 2010). ALT-C increased MDA-MB-231 cell migration at lower concentration. Previous studies in our laboratory have shown that ALT-C induces cell proliferation at low concentrations, whereas higher concentrations has an inhibitory effect, an effect known as bell-shape dose-concentration (Cominetti et al., 2004; Ramos et al., 2007). Growth factors also produce similar bell-shape response curves (Reynolds, 2010).

In summary, these results suggest that ALT-C induces distinct effects in different cell types of the tumor microenvironment by linking with $\alpha_2\beta_1$ integrin. ALT-C modulates the MMP activity and angiogenic factor expression that influence tumor progression. These results contribute to the understanding of the molecular mechanism of new anti-metastatic and anti angiogenic therapies targeting $\alpha_2\beta_1$ integrin-mediated processes.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge FAPESP (Processo 98/14138-2), CNPq and CAPES (Brazil) for the financial support provided to this research.

References

- Baudino, T.A., McKay, C., Pendeville-Samain, H., Nilsson, J.A., Maclean, K.H., White, E.L., Davis, A.C., Ihle, J.N., Cleveland, J.L., 2002. c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes & Development* 16, 2530–2543.
- Brandvold, K.A., Neiman, P., Ruddell, A., 2000. Angiogenesis is an early event in the generation of myc-induced lymphomas. *Oncogene* 19, 2780–2785.
- Brooks, S. a, Lomax-Browne, H.J., Carter, T.M., Kinch, C.E., Hall, D.M.S., 2010. Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta histochemica* 112, 3–25.
- Buchanan, C.F., Szot, C.S., Wilson, T.D., Akman, S., Metheny-Barlow, L.J., Robertson, J.L., Freeman, J.W., Rylander, M.N., 2012. Cross-talk between endothelial and breast cancer cells regulates reciprocal expression of angiogenic factors in vitro. *Journal of cellular biochemistry* 113, 1142–51.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55, 611–22.

- Carey, C.M., Bueno, R., Gutierrez, D. a, Petro, C., Lucena, S.E., Sanchez, E.E., Soto, J.G., 2012. Recombinant rubistatin (r-Rub), an MVD disintegrin, inhibits cell migration and proliferation, and is a strong apoptotic inducer of the human melanoma cell line SK-Mel-28. *Toxicol: official journal of the International Society on Toxinology* 59, 241–8.
- Cominetti, M.R., Terruggi, C.H.B., Ramos, O.H.P., Fox, J.W., Mariano-Oliveira, A., De Freitas, M.S., Figueiredo, C.C., Morandi, V., Selistre-de-Araujo, H.S., 2004. Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. *The Journal of biological chemistry* 279, 18247–55.
- Daly, C., Pasnikowski, E., Burova, E., Wong, V., Aldrich, T.H., Griffiths, J., Ioffe, E., Daly, T.J., Fandl, J.P., Papadopoulos, N., McDonald, D.M., Thurston, G., Yancopoulos, G.D., Rudge, J.S., 2006. Angiopoietin-2 functions as an autocrine protective factor in stressed endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 15491–6.
- Desch, A., Strozyk, E. a, Bauer, A.T., Huck, V., Niemeyer, V., Wieland, T., Schneider, S.W., 2012. Highly invasive melanoma cells activate the vascular endothelium via an MMP-2/integrin $\alpha\beta 5$ -induced secretion of VEGF-A. *The American journal of pathology* 181, 693–705.
- Dreys, J., 2008. VEGF and angiogenesis: implications for breast cancer therapy. *European Journal of Cancer Supplements* 6, 7–13.
- Feller, J.K., Mahalingam, M., 2013. C-Myc and Cutaneous Vascular Neoplasms. *The American Journal of dermatopathology* 35, 364–9.
- Ferrara, N., 2010. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine & growth factor reviews* 21, 21–6.
- Fullár, A., Kovalszky, I., Bitsche, M., Romani, A., Schartinger, V.H., Sprinzl, G.M., Riechelmann, H., Dudás, J., 2012. Tumor cell and carcinoma-associated fibroblast interaction regulates matrix metalloproteinases and their inhibitors in oral squamous cell carcinoma. *Experimental cell research* 318, 1517–27.
- Gebhardt, A., Frye, M., Herold, S., Benitah, S.A., Braun, K., Samans, B., Watt, F.M., Elsässer, H.-P., Eilers, M., 2006. Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1. *The Journal of Cell Biology* 172, 139–149.
- Geiger, T.R., Peeper, D.S., 2009. Metastasis mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* 1796, 293–308.
- Gialeli, C., Theocharis, A.D., Karamanos, N.K., 2011. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *The FEBS journal* 278, 16–27.

- Gomes, F.G., Nedel, F., Alves, A.M., Nör, J.E., Tarquinio, S.B.C., 2013. Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms. *Life sciences* 92, 101–7.
- González-Arriaga, P., Pascual, T., García-Alvarez, A., Fernández-Somoano, A., López-Cima, M.F., Tardón, A., 2012. Genetic polymorphisms in MMP 2, 9 and 3 genes modify lung cancer risk and survival. *BMC cancer* 12, 121.
- Hynes, R.O., 2002. Integrins: Bidirectional , Allosteric Signaling Machines In their roles as major adhesion receptors , integrins 110, 673–687.
- Johanna A. Joyce and Jeffrey W. Pollard, 2012. Microenvironmental regulation of metastasis 9, 239–252.
- Kim, D.S., Jang, Y.-J., Jeon, O.-H., Kim, D.-S., 2007. Saxatilin, a snake venom disintegrin, suppresses TNF- α -induced ovarian cancer cell invasion. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 40, 290–294.
- Ko, H.S., Lee, H., Kim, S., Lee, E., 2012. Piceatannol Suppresses Breast Cancer Cell Invasion through the.
- Kryczka, J., Stasiak, M., Dziki, L., Mik, M., Dziki, A., Cierniewski, C.S., 2012. Matrix metalloproteinase-2 cleavage of the β 1 integrin ectodomain facilitates colon cancer cell motility. *The Journal of biological chemistry* 287, 36556–66.
- Lin, E., Wang, Q., Swenson, S., Jadvar, H., Groshen, S., Ye, W., Markland, F.S., Pinski, J., 2010. The disintegrin contortrostatin in combination with docetaxel is a potent inhibitor of prostate cancer in vitro and in vivo. *The Prostate* 70, 1359–1370.
- Liu, H., Radisky, D.C., Yang, D., Xu, R., Radisky, E.S., Bissell, M.J., Bishop, J.M., 2012. MYC suppresses cancer metastasis by direct transcriptional silencing of α v and β 3 integrin subunits. *Nature cell biology* 14, 567–74.
- Lucena, S.E., Jia, Y., Soto, J.G., Parral, J., Cantu, E., Brannon, J., Lardner, K., Ramos, C.J., Seoane, A.I., Sánchez, E.E., 2012. Anti-invasive and anti-adhesive activities of a recombinant disintegrin, r-*viridistatin 2*, derived from the Prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 60, 31–9.
- Makrilia, N., Lappa, T., Xyla, V., Nikolaidis, I., Syrigos, K., 2009. The role of angiogenesis in solid tumours: an overview. *European journal of internal medicine* 20, 663–71.
- Marcinkiewicz, C., 2013. Applications of snake venom components to modulate integrin activities in cell-matrix interactions. *The international journal of biochemistry & cell biology* 45, 1974–86.
- Mariano-Oliveira, A., Coelho, A.L.J., Terruggi, C.H.B., Selistre-de-Araújo, H.S., Barja-Fidalgo, C., De Freitas, M.S., 2003. Alternagin-C, a nonRGD-disintegrin, induces

- neutrophil migration via integrin signaling. *European Journal of Biochemistry* 270, 4799–4808.
- Montenegro, C.F., Salla-Pontes, C.L., Ribeiro, J.U., Machado, A.Z., Ramos, R.F., Figueiredo, C.C., Morandi, V., Selistre-de-Araujo, H.S., 2012. Blocking $\alpha\beta 3$ integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. *Biochimie* 94, 1812–20.
- Nguyen, D.X., Bos, P.D., Massagué, J., 2009. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature reviews. Cancer* 9, 274–84.
- Nie, Z., Hu, G., Wei, G., Cui, K., Yamane, A., Resch, W., Wang, R., Green, D.R., Tessarollo, L., Casellas, R., Zhao, K., Levens, D., 2012. c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell* 151, 68–79.
- Ramirez, N.E., Zhang, Z., Madamanchi, A., Boyd, K.L., Rear, L.D.O., Nashabi, A., Li, Z., Dupont, W.D., Zijlstra, A., Zutter, M.M., 2011. The $\alpha 2 \beta 1$ integrin is a metastasis suppressor in mouse models and human cancer 121.
- Ramos, O.H.P., Terruggi, C.H.B., Ribeiro, J.U., Cominetti, M.R., Figueiredo, C.C., Bérard, M., Crepin, M., Morandi, V., Selistre-de-Araujo, H.S., 2007. Modulation of in vitro and in vivo angiogenesis by alternagin-C, a disintegrin-like protein from *Bothrops alternatus* snake venom and by a peptide derived from its sequence. *Archives of biochemistry and biophysics* 461, 1–6.
- Reynolds, A.R., 2010. Potential relevance of bell-shaped and u-shaped dose-responses for the therapeutic targeting of angiogenesis in cancer. *Doseresponse a publication of International Hormesis Society* 8, 253–284.
- Roh, M.R., Zheng, Z., Kim, H.S., Kwon, J.E., Jeung, H.-C., Rha, S.Y., Chung, K.Y., 2012. Differential expression patterns of MMPs and their role in the invasion of epithelial premalignant tumors and invasive cutaneous squamous cell carcinoma. *Experimental and molecular pathology* 92, 236–42.
- Saharinen, P., Eklund, L., Pulkki, K., Bono, P., Alitalo, K., 2011. VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis. *Trends in molecular medicine* 17, 347–362.
- Schmidt, S., Friedl, P., 2010. Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell and tissue research* 339, 83–92.
- Schultz, G.S., Wysocki, A., 2009. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 17, 153–62.
- Selistre-de-Araujo, H.S., Cominetti, M.R., Terruggi, C.H.B., Mariano-Oliveira, a, De Freitas, M.S., Crepin, M., Figueiredo, C.C., Morandi, V., 2005. Alternagin-C, a disintegrin-like protein from the venom of *Bothrops alternatus*, modulates

- alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]* 38, 1505–11.
- Sfiligoi, C., de Luca, A., Cascone, I., Sorbello, V., Fuso, L., Ponzone, R., Biglia, N., Audero, E., Arisio, R., Bussolino, F., Sismondi, P., De Bortoli, M., 2003. Angiopoietin-2 expression in breast cancer correlates with lymph node invasion and short survival. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 103, 466–74.
- Shin, S., Wolgamott, L., Yoon, S.-O., 2012. Integrin trafficking and tumor progression. *International journal of cell biology* 2012, 516789.
- Souza, D.H., Iemma, M.R., Ferreira, L.L., Faria, J.P., Oliva, M.L., Zingali, R.B., Niewiarowski, S., Selistre-de-Araujo, H.S., 2000. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. *Archives of biochemistry and biophysics* 384, 341–50.
- Staniszewska, I., Walsh, E.M., Rothman, V.L., Gaathon, A., Tuszynski, G.P., Calvete, J.J., Lazarovici, P., Marcinkiewicz, C., 2009. Effect of VP12 and viperistatin on inhibition of collagen-receptor-dependent melanoma metastasis. *Cancer biology therapy* 8, 1507–1516.
- Teklemariam, T., Seoane, A.I., Ramos, C.J., Sanchez, E.E., Lucena, S.E., Perez, J.C., Mandal, S. a, Soto, J.G., 2011. Functional analysis of a recombinant PIII-SVMP, GST-acocostatin; an apoptotic inducer of HUVEC and HeLa, but not SK-Mel-28 cells. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 57, 646–56.
- Werb, Z., 2012. E11. The tumour microenvironment in breast cancer. *European Journal of Cancer* 48, S24–S25.
- Wolf, K., Friedl, P., 2011. Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. *Trends in cell biology* 21, 736–44.
- Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U.H., Deryugina, E.I., Strongin, A.Y., Bröcker, E.-B., Friedl, P., 2003. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *The Journal of cell biology* 160, 267–77.
- World Health Organization, n.d. *Global Health and Aging*.
- Yang, R.-S., Tang, C.-H., Chuang, W.-J., Huang, T.-H., Peng, H.-C., Huang, T.-F., Fu, W.-M., 2005. Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 45, 661–9.
- Yilmaz, M., Christofori, G., 2010. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Molecular cancer research MCR* 8, 629–642.

- Yue, J., Zhang, K., Chen, J., 2012. Role of integrins in regulating proteases to mediate extracellular matrix remodeling. *Cancer microenvironment: official journal of the International Cancer Microenvironment Society* 5, 275–83.
- Zhang, Z., Ramirez, N.E., Yankeelov, T.E., Li, Z., Ford, L.E., Qi, Y., Pozzi, A., Zutter, M.M., 2008. $\alpha 2\beta 1$ integrin expression in the tumor microenvironment enhances tumor angiogenesis in a tumor cell-specific manner. *Blood* 111, 1980–1988.
- Zigrino, P., Kamiguti, A.S., Eble, J., Drescher, C., Nischt, R., Fox, J.W., Mauch, C., 2002. The reprotin jararhagin, a snake venom metalloproteinase, functions as a fibrillar collagen agonist involved in fibroblast cell adhesion and signaling. *The Journal of biological chemistry* 277, 40528–35.

Figures legends

Figure 1 – Integrin content analysis by flow cytometry on MDA-MB-231, human fibroblasts and HMEC-1 cells. +: 1% to 10%, ++: 11% to 50%, +++: 51% to 100%.

Figure 2 – ALT-C modulates MDA-MB-231, fibroblasts and HMEC-1 cell migration after wounding. ALT-C effect on MDA-MB-231(A), fibroblast(B) and HMEC-1(C) cells was plotted as a percentage of wound closure in 24 h after wounding. P value was determined using ANOVA followed by Tukey's test, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, compared to 10 nM. Representative photos of wounds were taken at time zero and 24 h after wounding.

Figure 3 - ALT-C inhibits MMP-9 activity in the conditioned medium of MDA-MB-231 cells . MMP-9 activity was detected in the conditioned medium after wounding and incubation with ALT-C for 24 h by band intensity (peak area) (A), ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. (B) Zymography in 1% gelatin-SDS-PAGE.

Figure 4 – ALT-C inhibits MMP-2 activity in the conditioned medium of human fibroblasts. MMP-2 activity was detected by band densitometry in the conditioned medium (peak area) after wounding and incubation with ALT-C for 24 h (A), * $p < 0.05$ compared to 0 nM. Zymography in 1% gelatin-SDS-PAGE (B).

Figure 5 – ALT-C inhibits MMP-2 activity in HMEC-1 cells conditioned medium. MMP-2 activity was detected by band densitometry in the conditioned medium (peak area) after wounding and incubation with ALT-C for 24 h (A), * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. Zymography in 1% gelatin-SDS-PAGE (B).

Figure 6 –ALT-C inhibits MMP-9 expression in MDA-MB-231 cells (A), MMP-2 expression in HF (B) but it has no effect on MMP-2 expression in HMEC-1 cells (C).

The values are represented in relative transcript abundance and P value was determined using ANOVA followed by Tukey's test. GAPDH was used endogenous control.

Figure 7- ALT-C modulates VEGF gene expression in MDA-MB-231 and human fibroblasts but it has no effect on HMEC-1. (A) ALT-C increases VEGF gene expression in MDA-MB-231 cells at lower concentrations (10 and 100 nM) but decreases VEGF expression at higher concentration (1000 nM), (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$). (B) ALT-C increases VEGF gene expression in human fibroblasts at all concentrations (* $p < 0.05$) but it does not affect HMEC-1. (D-F) No effect was observed on VEGF protein level in conditioned medium of the three cell types. The values are in arbitrary units and P value was determined using ANOVA followed by Tukey's test. GAPDH was used as endogenous control.

Figure 8 – ALT-C modulates c-MYC and ANG-2 gene expression in MDA-MB-231, human fibroblasts and HMEC-1 cells. (A) ALT-C induces c-MYC gene expression in MDA-MB-231, (B) human fibroblasts and (C) HMEC-1 cells (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). ALT-C decreases ANG-2 gene expression in (D) MDA-MB-231 and (E) HMEC-1 cells. The values are represented in relative transcript abundance and P value was determined using ANOVA followed by Tukey's test. Values were normalized to the level of GAPDH expression.

Figure 9 - ALT-C inhibits the transendothelial migration of MDA-MB-231 cells through HMEC-1 cells. (A) MDA-MB-231 cells were plated in wells containing HMEC-1 cells and FBS was used as a chemo attractant in the lower chamber. The cells were fixed, stained and counted (an average of eight fields from each treatment). The assay was performed in duplicate. The results were compared using ANOVA followed by a Tukey's test (** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$). (B) Cell morphology of treatments and control (0 nM). Bar represents 20 μm .

Fig.1

Cell line	Integrins									
	α_2	α_4	α_5	α_6	α_v	$\alpha_v\beta_3$	$\alpha_v\beta_5$	β_1	β_3	β_4
MDA-MB-231	+	+	+++	+	+	+	+	+++	+	++
Human fibroblasts	++	++	+++	++	+++	++	++	+++	++	++
HMEC-1	++	++	+++	++	+++	+	+	+++	++	+++

Fig. 2

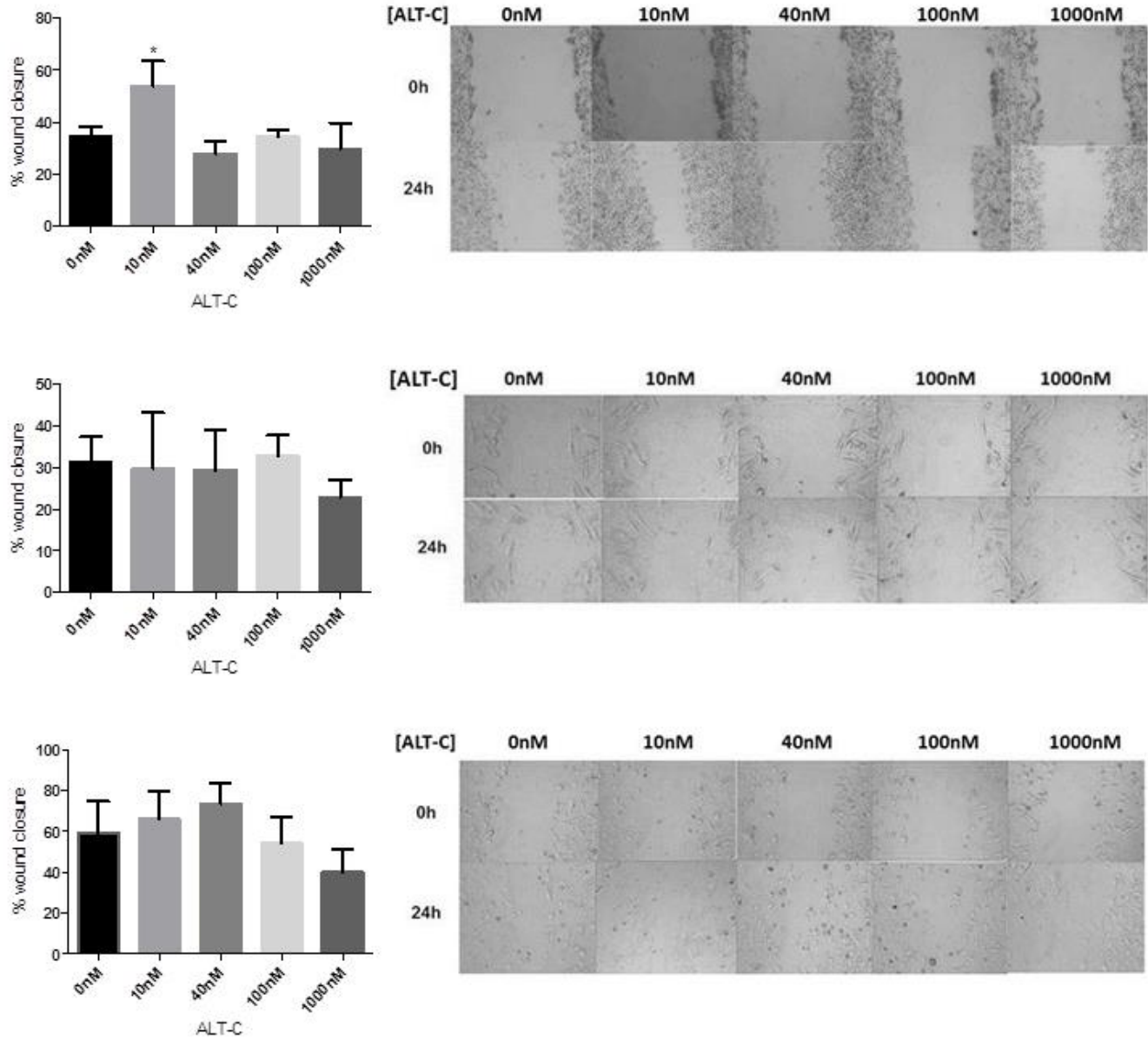


Fig.3

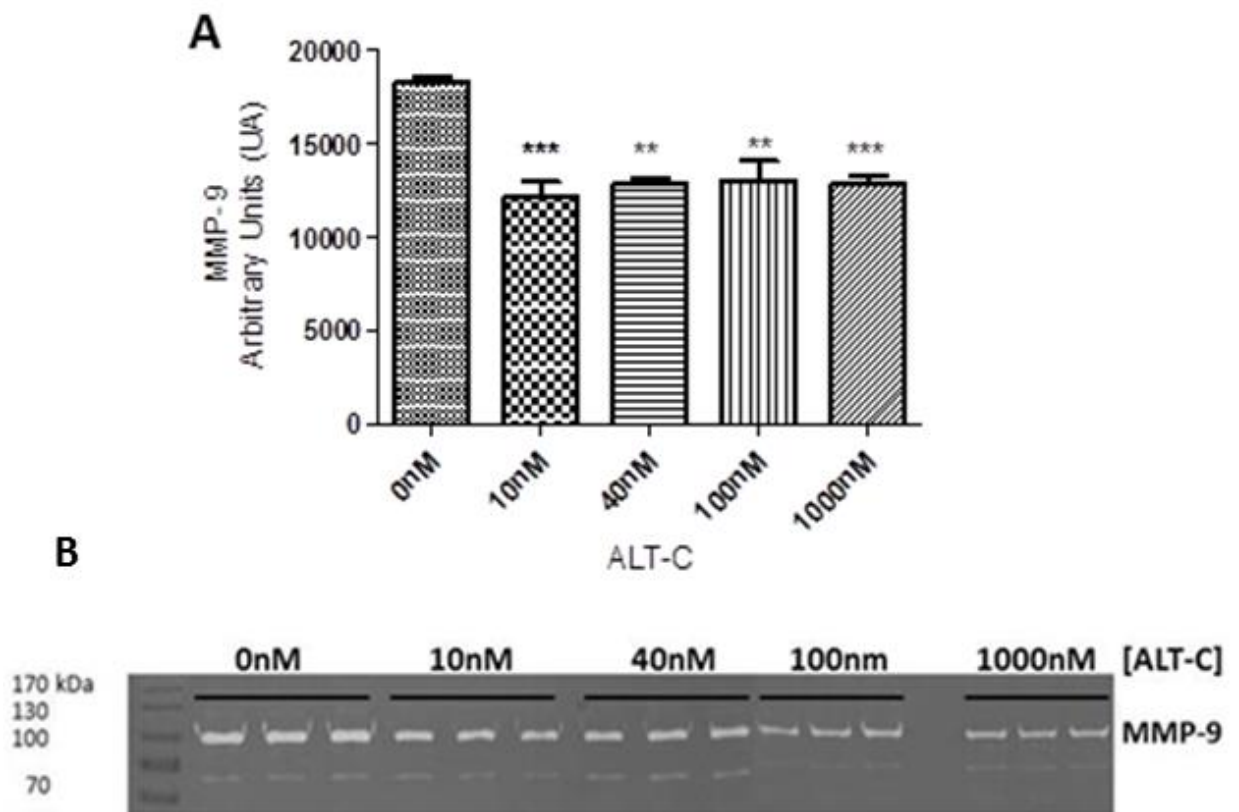


Fig.4

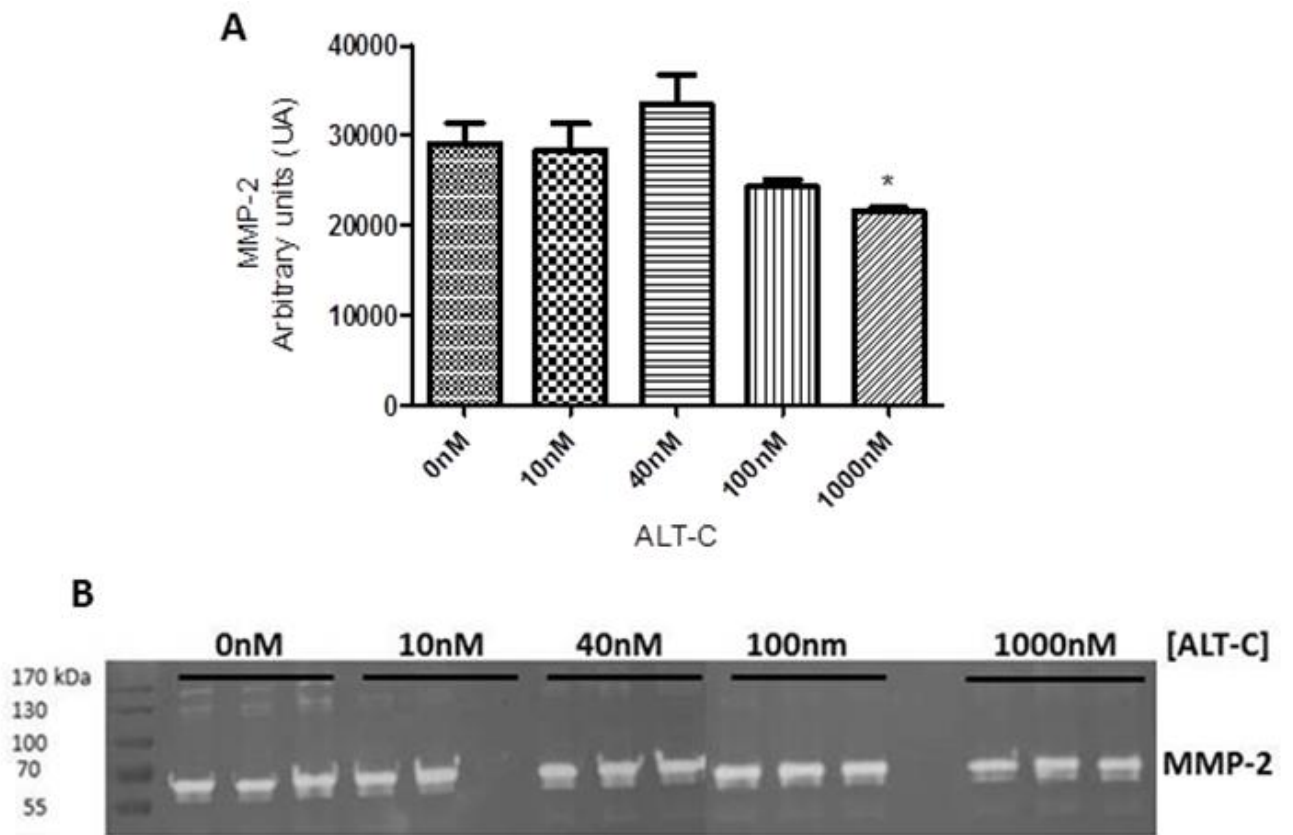


Fig.5

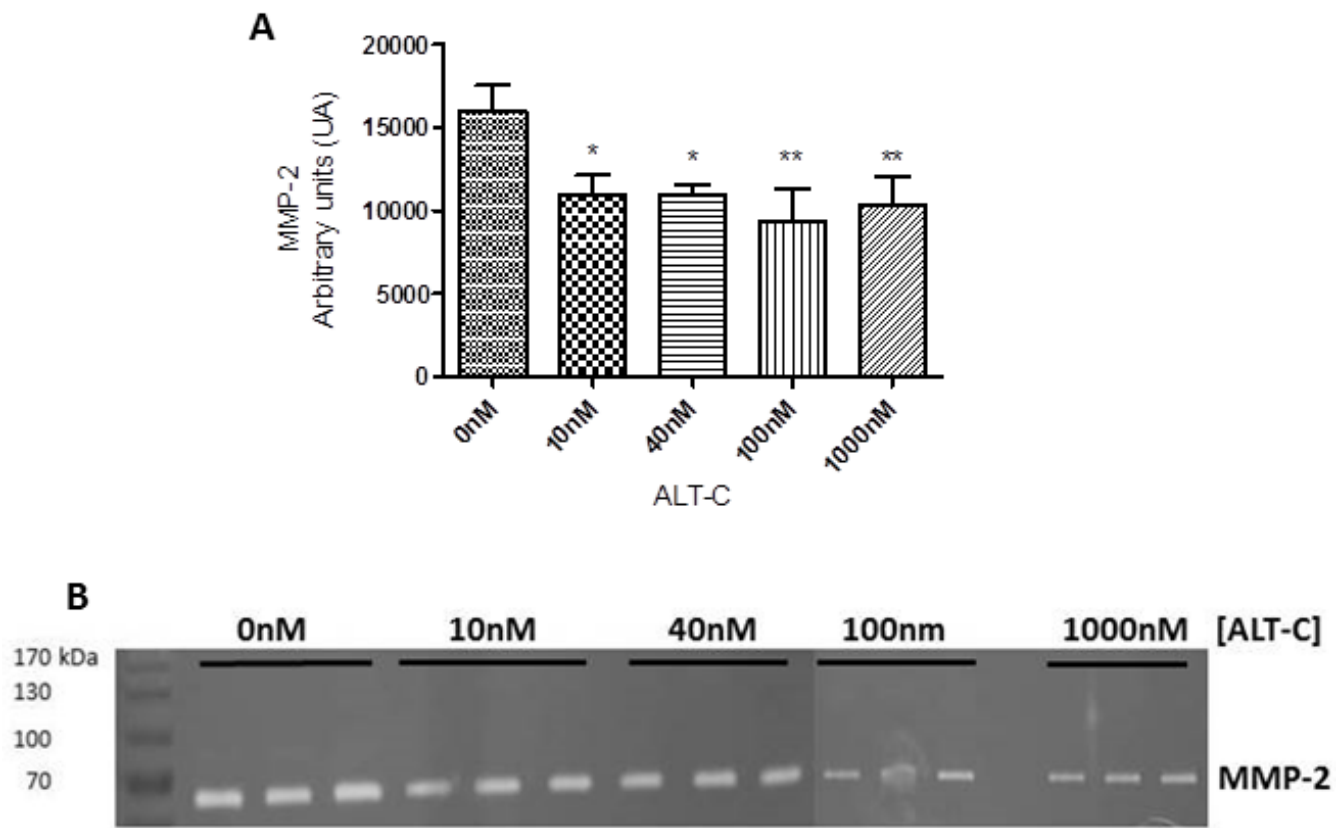


Fig.6

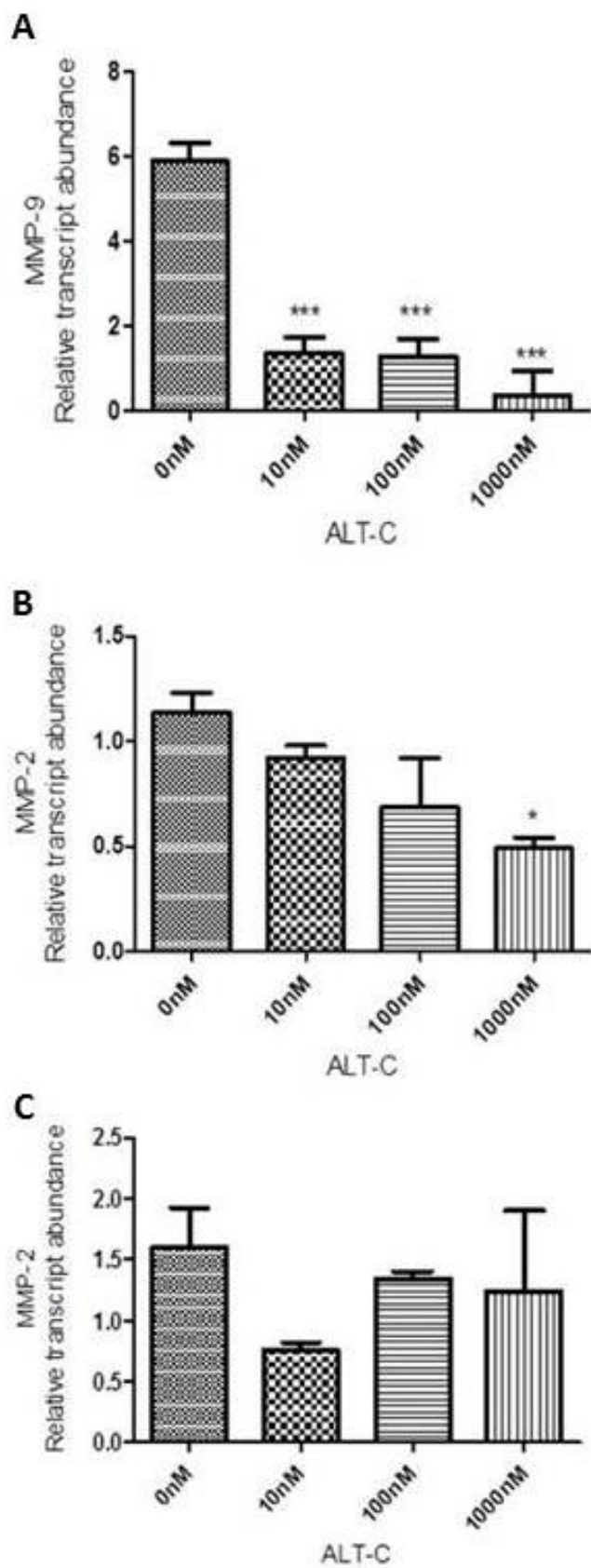


Fig.7

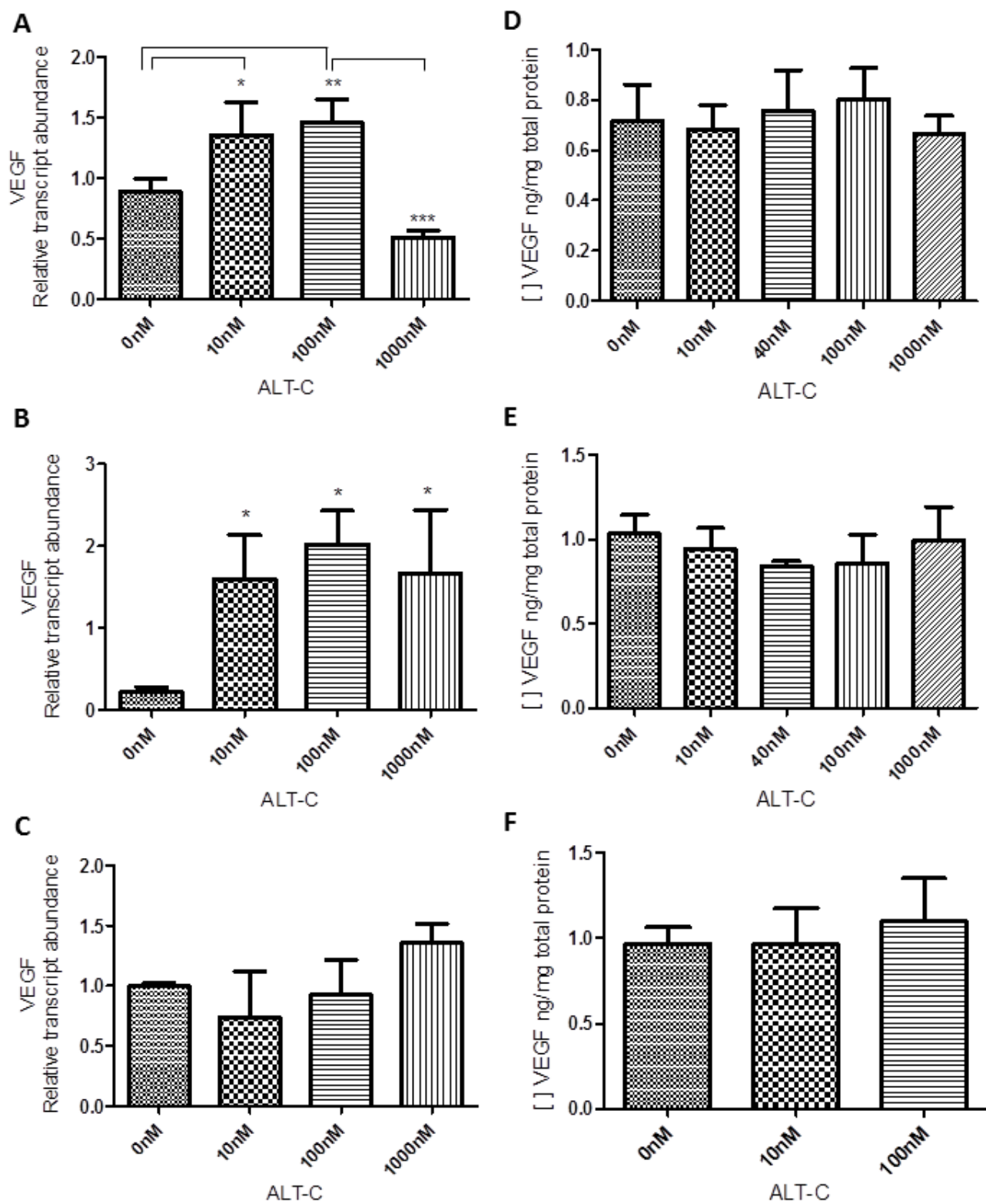


Fig.8

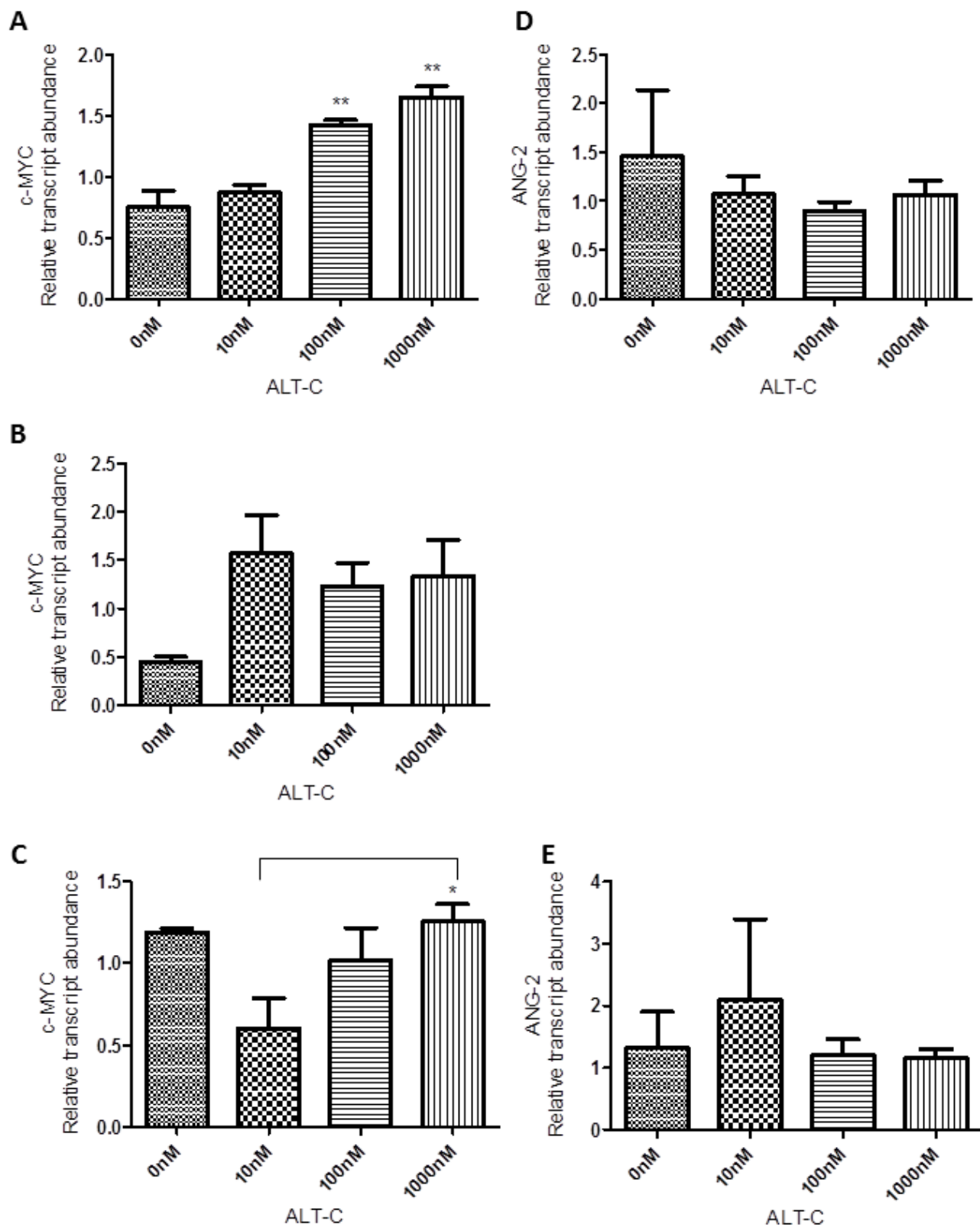


Fig.9

