

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

PATTY KARINA DOS SANTOS

ESTUDO DOS EFEITOS ANTIANGIOGÊNICOS DA
DESINTEGRINA-SÍMILE ALTERNAGINA-C (ALT-C) EM
CÉLULAS ENDOTELIAIS (HUVEC), TENDO COMO
ALVO A INTEGRINA $\alpha_2\beta_1$

SÃO CARLOS -SP
2020

PATTY KARINA DOS SANTOS

ESTUDO DOS EFEITOS ANTIANGIOGÊNICOS DA DESINTEGRINA-SÍMILE
ALTERNAGINA-C (ALT-C) EM CÉLULAS ENDOTELIAIS (HUVEC), TENDO COMO ALVO A
INTEGRINA $\alpha_2\beta_1$

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de Concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa Dra Heloisa Sobreiro
Selistre de Araujo

São Carlos-SP
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Patty Karina dos Santos, realizada em 04/03/2020.

Comissão Julgadora:

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

Prof. Dr. Gerson Monatan Rodrigues (UFSCar)

Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa lemma (UNIARA)

Profa. Dra. Hilde Harb Buzzá (USP)

Profa. Dra. Kelli Cristina Micocci (UFSCar)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

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

Dedico este trabalho à minha família,
a qual me apoiou quando eu mais
precisei de ajuda e atenção.

AGRADECIMENTOS

Finalmente chegou o momento! Depois de 4 anos cheios de alegria, risadas, companheirismo, obstáculos, falta de descanso e férias, noites de insônia e ansiedade, estou aqui, finalizando mais uma etapa da minha vida, o Doutorado! Foi fácil? Não, não foi nada fácil, mas conhecimento e aprendizado são coisas que levamos conosco e isso é o que importa, não é mesmo?

Eu não conseguiria passar esses últimos 4 anos estudando e tentando crescer profissionalmente se não fosse o apoio de toda a minha família. Por isso, em primeiro lugar, eu agradeço a vocês, pai, irmã, Henzinho e Mel, por toda a paciência com a minha pessoa *super* difícil de lidar em momentos estressantes. E principalmente **mãezinha**... Você não me viu trilhar o Doutorado... Me deixou antes disso, mas eu sei que aonde você estiver, você está orgulhosa de mim, me apoiando, me confortando, ouvindo minhas preces, meus choros, minhas risadas... Você está aqui comigo, dentro do meu coração em todos os milésimos de segundo destes últimos 1460 dias de trabalho científico. **Obrigada mãe! Te amo eternamente!**

Não poderia deixar de agradecer a Deus e aos anjos e espíritos protetores por toda a ajuda espiritual (e olha que eu precisei de muita ajuda nesses últimos meses!). Continuarei orando, pedindo, me esforçando para não desistir de viver! Então, por favor, continuem me auxiliando e me guiando nos meus momentos difíceis e nos meus momentos de conquista.

Um agradecimento especial à minha orientadora, a Profa. Dra. Heloisa, a qual me acolheu na Iniciação Científica, lá em 2008, quando eu não sabia nem o que era um gel de poliacrilamida, muito menos um *Western Blotting*. Obrigada pela orientação, pelos conselhos, por me aceitar no Mestrado, no TT3, e por fim, no Doutorado. Foram quase 12 anos me vendo quase todos os dias no laboratório, para lá e para cá, evoluindo e me transformando. Obrigada de coração.

Agradeço também a todos os amigos e companheiros do LBBM que me auxiliaram e que passaram pela minha vida, acrescentando algo a ela nesses últimos anos (tentarei não esquecer ninguém, mas a lista é relativamente grande!! Muita gente já passou pelo lab e eu fui ficando para trás hahaha). Obrigada Wan, Bih, Aninha, Anelyse, Julia, Bruna, Milene, Bete, Uli, Bianca, Gih, Karolzinha, Cyntia, Lívia, Carol, Kelli, Aline, Antonio e Larissa! Em especial, obrigada Grah, Rafa e Taís! Sem vocês, nossa! Não sei o que teria sido de mim! Obrigada por me ouvirem, me aconselharem, pelas risadas e lágrimas derramadas. Pelas idas ao shopping e nas cafeterias. Pela troca de conhecimento e incentivo a seguir o caminho do bem. Vocês têm um lugar especial em meu coração.

Também quero agradecer à profa. Mônica, à Tati, à profa. Anabelle, ao pessoal da Farmacologia, Carol Bellani, pelas conversas e trocas de conhecimento. Muito obrigada!

Agradeço às agências de fomento CAPES, FAPESP e CNPq pelo auxílio financeiro para a realização deste estudo.

É com muito carinho, gratidão, esforço e empenho que escrevi este trabalho (durante o Natal e o Ano Novo de 2019) e espero que ele contribua significativamente com a Ciência desse mundo imenso, sendo mais um tijolinho para se atingir o melhor tratamento de tumores e metástases. Obrigada a todos que me lerem no decorrer destas páginas! Obrigada!!!

“A coisa mais difícil da vida é resgatar o amor em meio à mágoa, o perdão em meio ao ressentimento, a alegria em meio à dor. Não fique preso ao sofrimento do passado. Liberte-se. Viva o presente. Só assim você poderá dar uma chance à felicidade e à cura do seu próprio coração. Deixe que o futuro lhe traga surpresas. Deixe o amor guiar sua vida. Ame, perdoe, viva.”

Patty Santos

RESUMO

A angiogênese é um processo crucial na progressão tumoral, sendo principalmente regulada pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seu receptor, o VEGFR2. Estudos mostraram que a sinalização do eixo VEGF/VEGFR2 está diretamente associada com as respostas funcionais das integrinas nas células endoteliais (*crosstalk*). A alternagina-C (ALT-C) é uma proteína desintegrina-símile, isolada da peçonha da serpente *Bothrops alternatus* (urutu), que interfere na adesão, na proliferação e na migração celular. Esta proteína possui alta afinidade pela integrina $\alpha_2\beta_1$, e é capaz de modular o processo angiogênico de forma concentração-dependente, por um mecanismo ainda não elucidado. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos antiangiogênicos da ALT-C em células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) na presença ou não de VEGF, assim como sua interferência no *crosstalk* entre a integrina $\alpha_2\beta_1$ e o receptor VEGFR2. Para tal, a ALT-C foi purificada da peçonha de *B. alternatus* e 1000 nM da proteína foi testada em diversos experimentos *in vitro* usando HUVECs. ALT-C inibiu significativamente a formação de túbulos pelas células endoteliais, além de diminuir os níveis proteicos da integrina $\alpha_2\beta_1$ e do VEGFR2. A desintegrina-símile afetou o citoesqueleto de actina das HUVECs, diminuindo o número de filopódios das mesmas, inibindo a migração e a adesão desta linhagem celular ao colágeno tipo 1. A ALT-C interferiu negativamente nas vias angiogênicas ERK 1/2, PI3K e FAK-Src/paxilina, além de induzir autofagia, mecanismo conhecido por inibir o processo angiogênico. Adicionalmente, ensaios de co-localização e ressonância plasmônica de superfície demonstraram que a ALT-C interage com a integrina $\alpha_2\beta_1$ e o VEGFR2, respectivamente, tendo uma afinidade dez vezes maior pela integrina. Todos estes resultados sugerem que a ALT-C, após ligação à integrina $\alpha_2\beta_1$, inibe a sinalização do VEGF, interferindo no *crosstalk* $\alpha_2\beta_1$ /VEGFR2, o que resulta em inibição da angiogênese. Concluímos que a ALT-C é uma forte candidata no tratamento antiangiogênico em processos tumorais e metastáticos.

Palavras-chave: ALT-C. Integrina $\alpha_2\beta_1$. VEGF. VEGFR2. Angiogênese. HUVEC.

ABSTRACT

Angiogenesis is a crucial process in tumor progression, and it is mainly regulated by the vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor, VEGFR2. Studies have shown that VEGF/VEGFR2 axis signaling is directly associated with functional responses of integrins in endothelial cells (crosstalk). Alternagin-C (ALT-C), a disintegrin-like protein from *Bothrops alternatus* snake venom, has high affinity for $\alpha_2\beta_1$ integrin, interfering in cell adhesion, proliferation and migration, besides modulating angiogenesis in a concentration-dependent form by a not completely understood mechanism. Here we evaluate the antiangiogenic activity of ALT-C in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) associated or not with VEGF, as well as its interference in $\alpha_2\beta_1$ /VEGFR2 crosstalk. ALT-C was purified from *B. alternatus* venom and 1000 nM of the protein was tested in several *in vitro* experiments using HUVECs. ALT-C strongly inhibited HUVEC tube formation and decreased VEGFR2 and $\alpha_2\beta_1$ protein levels. The disintegrin-like protein affected actin cytoskeleton, decreasing the number of cell filopodia, inhibiting HUVEC adhesion to collagen I and cell migration. ALT-C interfered in ERK 1/2, PI3K and FAK-Src/paxillin pathways, besides inducing autophagy, resulting in inhibition of the angiogenic process. Additionally, co-localization and surface plasmon resonance assays demonstrated that ALT-C interacts with $\alpha_2\beta_1$ and VEGFR2, respectively, having a 10-fold higher affinity for the integrin. All these results suggest that ALT-C, after binding to $\alpha_2\beta_1$ integrin, inhibits VEGF signaling by interfering in the $\alpha_2\beta_1$ /VEGFR2 crosstalk, which results in angiogenesis impairment. We conclude that ALT-C is a potential candidate for the development of antiangiogenic therapies for tumor and metastatic treatment.

Keywords: ALT-C. $\alpha_2\beta_1$ integrin. VEGF. VEGFR2. Angiogenesis. HUVEC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Angiogêneses fisiológica e tumoral.....	18
Figura 2 – A família VEGF e seus receptores.....	20
Figura 3 – A cascata angiogênica.....	24
Figura 4 – Etapas da Autofagia.....	27
Figura 5 – Potencial antiangiogênico da autofagia.....	29
Figura 6 – Estratégias para inibição da sinalização do VEGF.....	30
Figura 7 – Mecanismos de resistência à inibição do eixo VEGF/VEGFR2.....	31
Figura 8 – Visão geral das integrinas.....	33
Figura 9 – Ativação e sinalização das integrinas.....	34
Figura 10 – A integrina $\alpha_2\beta_1$	36
Figura 11 – Classificação das metaloproteinases de peçonhas de serpentes (SVMPs).....	38
Figura 12 – Linha do tempo da ALT-C.....	42
Figura 13 – Primeira etapa cromatográfica (gel filtração) da purificação da ALT-C em coluna Hiload® 16/600 Superdex® 200 pg (GE Healthcare).....	56
Figura 14 – Segunda etapa cromatográfica (gel filtração) da purificação da ALT-C em coluna Hiload® 16/600 Superdex® 200 pg (GE Healthcare).....	57
Figura 15 – Terceira etapa cromatográfica (troca aniônica) da purificação da ALT-C em coluna Mono Q™ 5/50 GL (GE Healthcare).....	58
Figura 16 – Gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE), copolimerizado com 0,1% de gelatina, obtido pelo ensaio de zimografia.....	59
Figura 17 – ALT-C se mostrou biologicamente ativa ao inibir a adesão de células K-562- $\alpha_2\beta_1$ ao COL1.....	60
Figura 18 – Confirmação da marcação da ALT-C com o fluoróforo Alexa Fluor®-546 através de ensaio de fluorescência.....	62
Figura 19 – HUVECs expressam grande quantidade de integrinas α_2 e β_1	63
Figura 20 – ALT-C altera a morfologia de células endoteliais (HUVEC) e diminui o número de filopódios celulares.....	65
Figura 21 – Tratamento com anticorpo bloqueador da integrina $\alpha_2\beta_1$ altera a morfologia de HUVECs e diminui o número de filopódios das células.....	68
Figura 22 – ALT-C em baixas concentrações (10 e 100 nM) não altera a morfologia de HUVECs.....	70
Figura 23 – Co-localização entre ALT-C e a integrina $\alpha_2\beta_1$ na superfície celular de HUVECs.....	72
Figura 24 – ALT-C revela mudanças no padrão de distribuição da integrina $\alpha_2\beta_1$ em HUVECs aderidas à diferentes proteínas da matriz extracelular (<i>coating</i>).....	74
Figura 25 – ALT-C inibe a adesão de HUVECs ao COL1 e diminui os níveis proteicos de $\alpha_2\beta_1$ mesmo na presença de VEGF.....	76
Figura 26 – ALT-C inibe os processos de viabilidade e migração celular em HUVECs induzidas com VEGF.....	79
Figura 27 – ALT-C (200 e 1000 nM) inibe a tubulogênese em HUVECs, diminuindo	

diversos parâmetros angiogênicos.....	82
Figura 28 – ALT-C diminui o conteúdo proteico de VEGFR2 total em HUVECs.....	84
Figura 29 – ALT-C interage com o VEGFR2.....	86
Figura 30 – ALT-C inibe a fosforilação de VEGFR2 e de β_1 após estimulação com VEGF em um curto período de tempo, interferindo no <i>crosstalk</i> $\alpha_2\beta_1$ /VEGFR2.....	87
Figura 31 – ALT-C interfere na sinalização de FAK/Src e Paxilina mediada por VEGF.....	89
Figura 32 – Tratamento com anticorpo bloqueador da integrina $\alpha_2\beta_1$ inibiu a fosforilação de FAK em HUVECs num período curto de tempo.....	90
Figura 33 – ALT-C interfere na sinalização de ERK 1/2 e PI3K mediada por VEGF.....	92
Figura 34 – ALT-C aumenta o conteúdo proteico de LC3B, induzindo autofagia em HUVECs.....	94
Figura 35 – ALT-C aumenta o conteúdo proteico de Beclin-1 na presença de VEGF, promovendo autofagia em HUVECs.....	96
Figura 36 – ALT-C inibe a integrina $\alpha_2\beta_1$, interferindo no <i>crosstalk</i> $\alpha_2\beta_1$ /VEGFR2, com subsequente inibição da sinalização do VEGF e diminuição da angiogênese..	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações e molaridades de três frações de ALT-C marcadas com Alexa Fluor [®] -546.....	60
Tabela 2 – ALT-C (200 e 1000 nM) inibiu todos os parâmetros angiogênicos testados no ensaio de tubulogênese.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Ac:** Anticorpo
- Akt/PKB:** Quinase serina-treonina/proteína quinase B
- ALT-C:** Alternagina-C
- ANOVA:** Análise de variância
- APC:** *Allophycocyanin* (Alofococianina)
- Atgs:** *Autophagy-related proteins* (Proteínas relacionadas à autofagia)
- BCA:** *Bicinchoninic acid* (Ácido bicinconínico)
- BSA:** *Bovine serum albumin* (Albumina de soro bovino)
- COL1:** Colágeno tipo 1
- COL4:** Colágeno tipo 4
- DAPI:** 4',6'-diamino-2-fenil-indol
- D/ECD:** Aspartato/glutamato-cisteína-aspartato
- DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Meio Eagle modificado por Dulbecco)
- DMF:** N,N-Dimetilformamida
- EDC:** Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida
- EDTA:** Ácido etilendiamino tetra-acético
- ERK 1/2:** *Extracellular signal-regulated kinases 1/2* (Quinases reguladas por sinal extracelular 1/2)
- FAK:** *Focal Adhesion Kinase* (Quinase de adesão focal)
- FBS:** *Fetal Bovine Serum* (Soro fetal bovino)
- FGF-1:** *Fibroblast Growth Factor-1* (Fator de crescimento de fibroblasto 1)
- FGF-2:** *Fibroblast Growth Factor-2* (Fator de crescimento de fibroblasto 2)
- FITC:** *Fluorescein Isothiocyanate* (Isotiocianato de fluoresceína)
- FPV:** Fator de permeabilidade vascular tumoral
- GRF-Matrigel:** *Growth Factor Reduced-Matrigel* (Matrigel com fator de crescimento reduzido)
- HIF-1:** *Hypoxia-inducible factor-1* (Fator induzido por hipóxia-1)
- HMECs:** *Human Microvascular Endothelial Cells* (Células endoteliais microvasculares humanas)
- HUVECs:** *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (Células endoteliais de cordão umbilical humano)
- IGF-1:** *Insulin-like Growth Factor* (Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1)
- ITKs:** inibidores tirosina quinase
- K-562:** Linhagem celular eritroleucêmica
- K_d:** Constante de dissociação
- kDa:** Quilo Dalton
- KGD:** Lisina-glicina-aspartato
- K/RGD:** Lisina/arginina-glicina-aspartato
- LC3:** *Microtubule-associated protein light chain 3* (Cadeia leve 3 da proteína 1 associada à microtúbulos)
- LDV:** Leucina-aspartato-valina
- LEV:** Leucina-glutamato-valina

MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinase* (Superfamília das quinases ativadas por mitógenos)

MAP1LC3: *Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3* (Família de cadeia leve 3 da proteína 1 associada à microtúbulos)

MEC: Matriz extracelular

MGD: Metionina-glicina-aspartato

MLD: Metionina-leucina-aspartato

MMPs: Metaloproteinases de matriz

MMP-2: Metaloproteinase de matriz 2

mPa: Milipascal

MVD: Metionina-valina-aspartato

NaN₃: Azida sódica

NHS: n-hidroxissuccinimida

PBS: *Phosphate-buffered saline* (Solução tampão fosfato)

PDGF: *Platelet-derived Growth Factor* (Fator de crescimento derivado de plaqueta)

PE: *Phycocerythrin* (Ficoeritrina)

PIGF1-4: *Placental Growth Factor 1-4* (Fatores de crescimento placentar 1 a 4)

PI3K: *Phosphoinositide 3-kinase* (Fosfoinosítideo 3-quinase)

rcf: Força centrífuga relativa

RGD: Arginina-glicina-aspartato

R/KTS: Arginina/lisina-treonina-serina

rpm: Rotações por minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

RPS: Ressonância Plasmônica de Superfície

SDS-PAGE: Dodecil-sulfato de sódio de poliácridamida

SEM: *Standard error of the mean* (Erro padrão da média)

SNARE: *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors* (Complexo receptor de proteínas de ligação solúveis sensíveis à N-etilmaleimida)

Src: *Steroid Receptor Coactivator* (Receptor de esteroide)

SVMPs: *Snake Venom Metalloproteinases* (Metaloproteinases de peçonhas de serpente)

tEND: Endotélio tímico

TGF-β: *Transforming Growth Factor Beta* (Fator de transformação de crescimento beta)

UA: Unidade arbitrária

U.I.: Unidade Internacional

UR: Unidades de ressonância

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor* (Fator de crescimento endotelial vascular)

VEGFR1-3: *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1-3* (Receptores tirosina quinase 1 a 3 do VEGF)

WGD: Triptofano-glicina-aspartato

WT: *wild type* (selvagem)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 ANGIOGÊNESE.....	17
1.1.1 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)	18
1.1.2 Etapas da Cascata Angiogênica	22
1.2 A REGULAÇÃO DA ANGIOGÊNESE E SUA RELAÇÃO COM AS TERAPIAS ANGIOGÊNICAS.....	25
1.2.1 Papel da Autofagia no Tratamento da Angiogênese Tumoral	26
1.2.2 Fatores Antiangiogênicos	29
1.3 INTEGRINAS.....	32
1.3.1 A Família β_1 e a Integrina $\alpha_2\beta_1$	35
1.4 METALOPROTEINASES DE PEÇONHAS DE SERPENTES (SVMP).....	37
1.5 DESINTEGRINAS.....	39
1.6 DESINTEGRINAS-SÍMILE.....	40
1.6.1 Alternagina-C (ALT-C)	41
2 HIPÓTESE E OBJETIVOS	45
2.1 HIPÓTESE.....	45
2.2 OBJETIVO GERAL.....	45
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1 PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA ALT-C.....	46
3.2 VERIFICAÇÃO DA PUREZA DA ALT-C POR ENSAIO DE ZIMOGRÁFIA.....	46
3.3 MARCAÇÃO DA ALT-C COM O FLUORÓFORO ALEXA FLUOR®-546.....	47
3.4 CULTURA CELULAR.....	48
3.5 CITOMETRIA DE FLUXO.....	49
3.6 ENSAIO DE MORFOLOGIA CELULAR.....	49
3.7 ENSAIO DE CO-LOCALIZAÇÃO.....	50
3.8 ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA PARA AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE HUVECS À DIFERENTES PROTEÍNAS DE MATRIZ NA PRESENÇA DE ALT-C.....	50
3.9 INIBIÇÃO DA ADESÃO CELULAR.....	51
3.10 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	51
3.11 ENSAIO DE MIGRAÇÃO <i>TRANSWELL</i>	52
3.12 ENSAIO DE ANGIOGÊNESE SOBRE MATRIGEL (TUBULOGÊNESE).....	52
3.13 RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE.....	53
3.14 DETECÇÃO DE VEGFR2 E LC3B POR IMUNOFLORESCÊNCIA.....	53
3.15 <i>WESTERN BLOTTING</i>	54
3.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 PURIFICAÇÃO DA DESINTEGRINA-SÍMILE ALT-C.....	56
4.2 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DA ALT-C PURIFICADA.....	58
4.3 MARCAÇÃO DA ALT-C COM O FLUORÓFORO ALEXA FLUOR®-546.....	60
4.4 A LINHAGEM CELULAR HUVEC EXPRESSA GRANDE QUANTIDADE DE INTEGRINAS α_2 E β_1	63
4.5 ALT-C ALTERA A MORFOLOGIA DE HUVEC E DIMINUI O NÚMERO DE FILOPÓDIOS	

CELULARES.....	64
4.6 ALT-C CO-LOCALIZOU COM A INTEGRINA $\alpha_2\beta_1$ EM HUVEC.....	71
4.7 ALT-C REVELA MUDANÇAS NO PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DA INTEGRINA $\alpha_2\beta_1$ EM HUVEC DE MANEIRA DEPENDENTE DO REVESTIMENTO PROTEICO	73
4.8 ALT-C DIMINUIU A ADESÃO CELULAR AO COLÁGENO TIPO 1 E REDUZIU OS NÍVEIS PROTEICOS DE α_2 E β_1 EM HUVEC NA PRESENÇA DE VEGF.....	75
4.9 ALT-C INIBIU OS PROCESSOS DE VIABILIDADE E MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDOS POR VEGF.....	78
4.10 ALT-C INIBIU A FORMAÇÃO DE TÚBULOS EM HUVEC.....	80
4.11 ALT-C DIMINUIU O CONTEÚDO PROTEICO DE VEGFR2 EM HUVEC.....	83
4.12 ALT-C INTERFERIU NO <i>CROSSTALK</i> $\alpha_2\beta_1$ /VEGFR2.....	86
4.13 ALT-C INTERFERIU NA SINALIZAÇÃO DE FAK/SRC E PAXILINA EM HUVEC.....	88
4.14 ALT-C INIBIU A ATIVAÇÃO DAS VIAS ERK 1/2 E PI3K MEDIADAS PELO VEGFR2 EM HUVEC.....	91
4.15 ALT-C AUMENTOU O CONTEÚDO PROTEICO DO MARCADOR AUTOFÁGICO LC3B.....	93
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
6 CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS.....	100
ANEXO A – Artigos Publicados.....	111

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANGIOGÊNESE

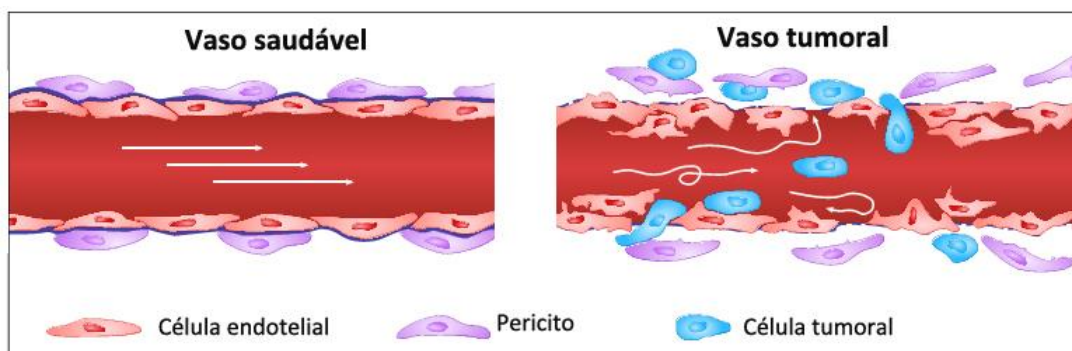
A angiogênese é o processo biológico de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, o qual depende de um delicado equilíbrio entre fatores pró- e antiangiogênicos no microambiente celular (FOLKMAN, 2002; OKLU et al., 2010; RIBATTI, 2014; ZHAO; LI, 2015; POTENTE; CARMELIET, 2017; ZAKRAOUI et al., 2017). Em mamíferos, a angiogênese fisiológica ocorre normalmente durante o desenvolvimento embrionário, no crescimento, na regeneração tecidual e na reorganização cíclica dos tecidos reprodutores femininos (HANAHAN; WEINBERG, 2011; ZHAO; LI, 2015). Quando não estão participando ativamente destes eventos, as células endoteliais dos vasos sanguíneos permanecem quiescentes, com uma taxa de duplicação de apenas 0,01% (CARMELIET; JAIN, 2000; RAMOS et al., 2007).

Em situações patológicas (inflamações crônicas, retinopatia diabética, degeneração macular relacionada à idade, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e câncer) há a perda ou a formação desregulada e persistente de novos vasos sanguíneos por um processo conhecido como angiogênese patológica (NAGY; DVORAK; DVORAK, 2007; SEAMAN et al., 2007; CHUNG; FERRARA, 2011). Durante o crescimento do tumor, por exemplo, um desequilíbrio em favor do estímulo de fatores proangiogênicos desencadeia a angiogênese tumoral, a qual fornece oxigênio e nutrientes para as células tumorais (GOLUBKOV; HAWES; MARKLAND, 2003; RONCA et al., 2017; ROHLENOVA et al., 2018). A vasculatura tumoral é altamente desorganizada e formada por um mosaico de células tumorais e endoteliais com a ausência de pericitos funcionais, acarretando num fluxo sanguíneo caótico e variável (Figura 1) (CARMELIET; JAIN, 2000; ROHLENOVA et al., 2018). Ademais, os novos vasos anormais com alta permeabilidade vascular ajudam as células tumorais a se disseminarem através da circulação sanguínea, aumentando o processo metastático (GOLUBKOV; HAWES; MARKLAND, 2003; RONCA et al., 2017).

Estudos demonstraram que tanto a angiogênese fisiológica quanto a tumoral são desencadeadas principalmente por hipóxia tecidual em conjunto com

outras formas de estresse, como baixo pH e baixo nível de glicose (CARMELIET; JAIN, 2000; OKLU et al., 2010; HALL et al., 2015). Sob condições hipóxicas, o fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1) é altamente expresso em células endoteliais, resultando na indução da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (CARMELIET; JAIN, 2000; CHUNG; LEE; FERRARA, 2010; OKLU et al., 2010; HALL et al., 2015). Outros fatores que colaboram para a promoção da angiogênese são: o fator de crescimento de fibroblasto 1 (FGF-1), o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) e o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) (OKLU et al., 2010).

Figura 1 – Angiogêneses fisiológica e tumoral



Durante a angiogênese fisiológica, a vasculatura saudável apresenta células endoteliais interconectadas e firmemente aderidas a uma lâmina basal intacta, tendo suporte de pericitos. Em contrapartida, na angiogênese tumoral, observam-se vasos desorganizados e funcionalmente deficientes, com células endoteliais dilatadas, lâmina basal rompida e pericitos afuncionais, resultando em um fluxo sanguíneo caótico e em infiltração das células tumorais na corrente sanguínea. Imagem adaptada de ROHLENOVA et al., *Trends in Cell Biology* (2018).

1.1.1 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

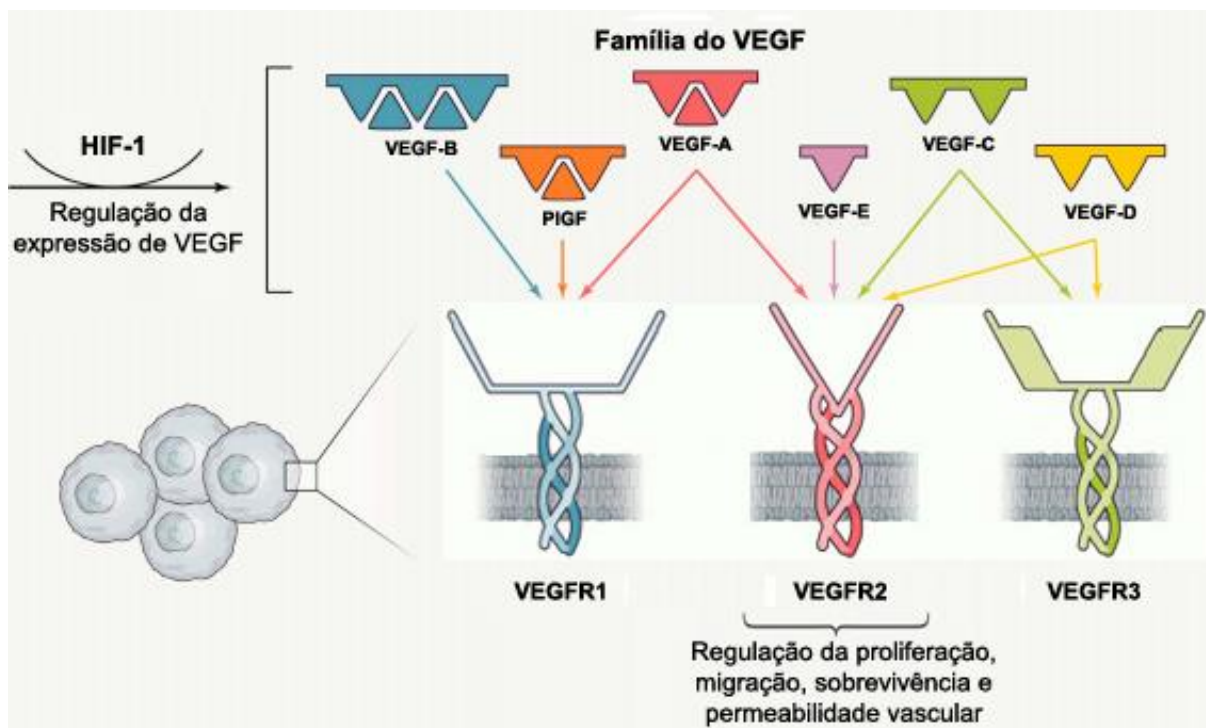
Estudos promovidos por diferentes linhas de pesquisa culminaram na identificação do VEGF em meados dos anos 80. Em 1983, Senger e colaboradores purificaram do meio condicionado de células tumorais de porquinho-da-índia, uma proteína capaz de aumentar a permeabilidade vascular, a qual nomearam de “fator de permeabilidade vascular tumoral” (FPV) (SENGER et al., 1983). Já em 1989, Ferrara e Henzel descreveram o isolamento de uma proteína difusível do meio condicionado de células foliculares bovinas, nomeando-a de “fator de crescimento

endotelial vascular” (VEGF), nome que indicava a especificidade que essa molécula tinha pelas células endoteliais (FERRARA; HENZEL, 1989). No mesmo ano, análises de sequenciamento proteico de ambos os fatores indicaram que o FPV e o VEGF tratavam-se da mesma proteína, surpreendendo ambos os grupos de pesquisa (KECK et al., 1989; LEUNG et al., 1989; FERRARA, 2004; FERRARA; ADAMIS, 2016).

Os fatores de crescimento endotelial vascular englobam uma família proteica composta por VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fatores de crescimento placentar (PIGF1-4), os quais se ligam a três receptores tirosina quinase (VEGFR1-3) com diferentes afinidades (Figura 2) (EICHMANN; SIMONS, 2012; FERRARA; ADAMIS, 2016; TANG et al., 2016; ADINI et al., 2017; APTE; CHEN; FERRARA, 2019). Adicionalmente, homólogos do VEGF foram identificados no genoma de vírus do gênero *Parapoxvirus*, sendo denominados de VEGF-E (LYTTLE et al., 1994; OGAWA et al., 1998).

Os receptores de VEGF possuem sete domínios extracelulares do tipo imunoglobulina, um domínio transmembrana e um domínio tirosina quinase intracelular conservado (PAPETTI; HERMAN, 2002; ZHUANG; FERRARA, 2015). O VEGF-A se liga com maior afinidade aos receptores VEGFR1 e VEGFR2, enquanto que o VEGF-B e os PIGF se ligam preferencialmente ao VEGFR1 e o VEGF-E ao VEGFR2 (CHUNG; LEE; FERRARA, 2010). Já os VEGF-C e VEGF-D interagem com o VEGFR3, regulando a linfangiogênese, mas ambos podem se ligar ao VEGFR2 após clivagem proteolítica (Figura 2) (CARMELIET, 2005; CHUNG; LEE; FERRARA, 2010; APTE; CHEN; FERRARA, 2019).

Figura 2 – A família VEGF e seus receptores



A família dos fatores de crescimento endotelial vascular engloba as proteínas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e PIGF. O fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1) regula a expressão do VEGF em condições hipóxicas. A sinalização ativada principalmente pela ligação do VEGF-A ao receptor VEGFR2 regula as atividades de diversas proteínas, as quais promovem proliferação e migração celular, sobrevivência e permeabilidade vascular durante o processo angiogênico. Imagem adaptada de APTE; CHEN; FERRARA, *Cell* (2019).

O VEGF-A é considerado o mediador da angiogênese fisiológica e tumoral e exerce suas funções após interação com o VEGFR2 (KIEC-WILK et al., 2010; CARMELIET; JAIN, 2011; TONG et al., 2015; SORRELLE; BREKKEN, 2016; RAMJIAWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017; TOIVANEN et al., 2017). Ele é um potente fator proangiogênico ligante de heparina de aproximadamente 45 kDa, que regula o desenvolvimento das células tronco hematopoiéticas, o remodelamento da matriz extracelular (MEC), a liberação de enzimas como os ativadores de plasminogênio e a produção de citocinas inflamatórias, além de ser o principal regulador da formação de vasos sanguíneos e do crescimento metastático durante a tumorigênese (FERRARA, 2002; CARMELIET, 2005; CHAMORRO-JORGANES et al., 2016; TANG et al., 2016).

O *splicing* alternativo do gene VEGF-A dá origem a diferentes isoformas denominadas VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₉ e VEGF-A₂₀₆, com 121, 165, 189 e 206 aminoácidos, respectivamente (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003;

ZHUANG; FERRARA, 2015). VEGF-A₁₂₁ é um polipeptídeo ácido difusível que não se liga à heparina, enquanto que os básicos VEGF-A₁₈₉ e VEGF-A₂₀₆ se ligam à heparina com grande afinidade, interagindo fortemente com a MEC (FERRARA; GERBER; LECOATER, 2003). Já o VEGF-A₁₆₅, nomeado apenas como VEGF-A, é a isoforma predominante, sendo difusível, mas com uma pequena fração ligada à superfície da matriz extracelular (FERRARA; GERBER; LECOATER, 2003; FERRARA, 2009).

De maneira interessante, os níveis de VEGF-A são regulados pela presença ou ausência de oxigênio. Ambientes hipóxicos induzem rapidamente a expressão de VEGF através do aumento de sua transcrição, enquanto que a normoxia diminui a produção do fator proangiogênico, podendo até mesmo causar regressão de alguns vasos recém-formados (LIEKENS; DE CLERCQ; NEYTS, 2001).

Nas células endoteliais, a ligação do VEGF-A ao VEGFR2 leva à dimerização e à auto fosforilação do receptor (CARMELIET, 2005; FERRARA; ADAMIS, 2016). Diversos resíduos de tirosina são fosforilados, incluindo Y1054 e Y1059 (domínio intracelular), cuja fosforilação é crucial para a atividade de quinase do VEGFR2 (ZHUANG; FERRARA, 2015). Cabe ressaltar, que apesar do VEGF-A ter mais afinidade pelo VEGFR1, este receptor tem como função principal modular a disponibilidade do VEGF que se ligará ao VEGFR2 (CARMELIET, 2005).

A ativação do VEGFR2 mediada pelo VEGF induz a fosforilação de proteínas de diversas vias de sinalização, como a via das quinases reguladas por sinal extracelular 1/2 (ERK 1/2), da fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K), da quinase de adesão focal (FAK) e da paxilina (GERBER; FERRARA, 2003; MUÑOZ-CHÁPULI; QUESADA; MEDINA, 2004; TONG et al., 2015; FERRARA; ADAMIS, 2016). A indução dessas vias é responsável por promover degradação da MEC, permeabilidade vascular, sobrevivência, diferenciação, proliferação, extensão de filopódios e migração de células endoteliais, passos considerados críticos durante a cascata angiogênica (MUÑOZ-CHÁPULI; QUESADA; MEDINA, 2004; TONG et al., 2015; FERRARA; ADAMIS, 2016; POTENTE; CARMELIET, 2017; APTE; CHEN; FERRARA, 2019).

1.1.2 Etapas da Cascata Angiogênica

A cascata angiogênica obedece a uma sequência altamente organizada de eventos, a qual requer a participação de diversas células, múltiplas moléculas específicas e componentes da MEC que são regulados de maneira espacial e temporal (Figura 3) (LIEKENS; DE CLERCQ; NEYTS, 2001; CLAPP et al., 2009).

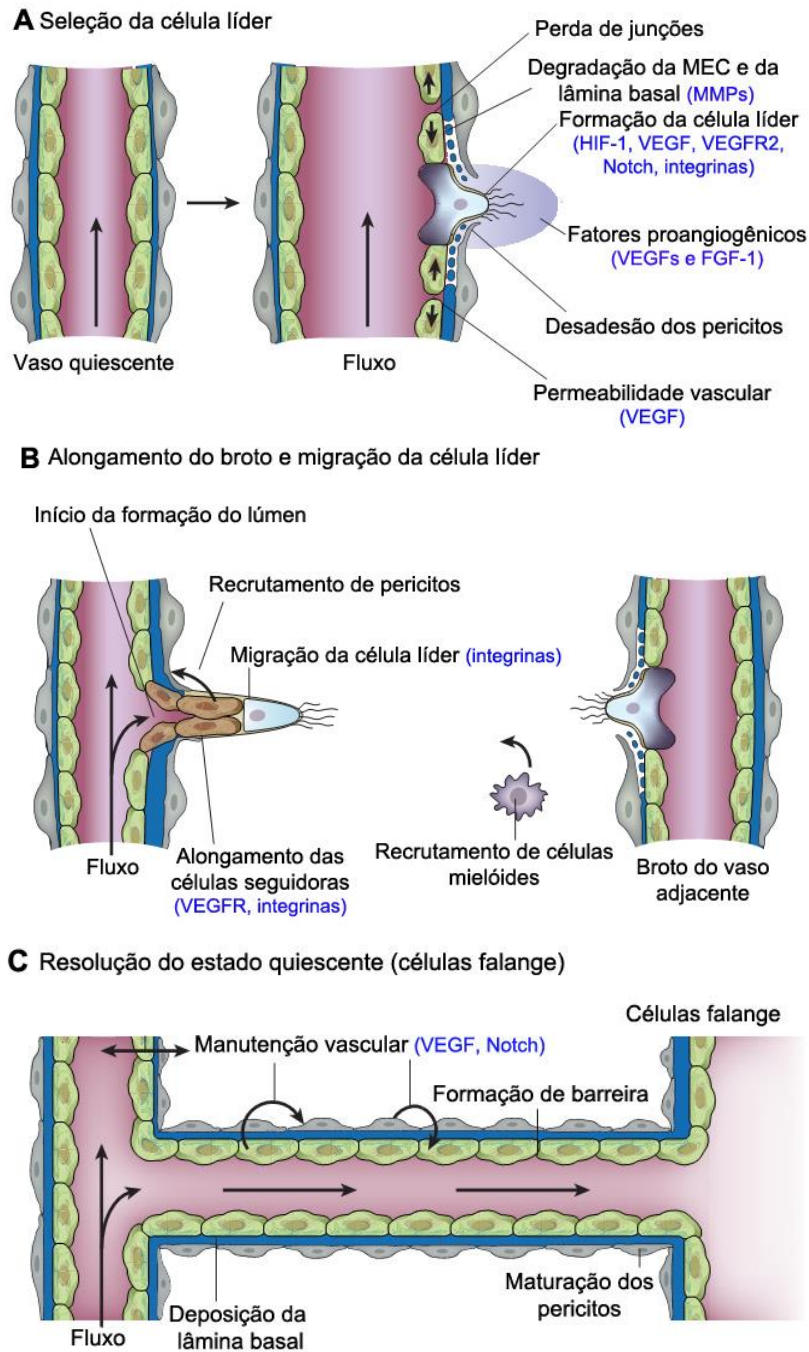
Após o estímulo da resposta angiogênica desencadeado por HIF-1 e VEGF, ocorre a alteração das interações adesivas entre as células endoteliais quiescentes e os pericitos preexistentes, os quais se desaderem da parede do vaso, se soltando da lâmina basal devido ao aumento da permeabilidade vascular (Figura 3A) (CLAPP et al., 2009; OKLU et al., 2010; CARMELIET; JAIN, 2011). As células endoteliais passam a produzir novas moléculas como, por exemplo, enzimas proteolíticas (metaloproteinases de matriz - MMPs), responsáveis pela degradação da lâmina basal e da MEC, eventos que levam à reorganização do citoesqueleto e disparam a morfogênese do broto capilar (Figura 3A) (STETLER-STEVENSON, 1999; CHUNG; LEE; FERRARA, 2010).

Para evitar que as células endoteliais migrem em conjunto na direção do estímulo angiogênico, uma célula endotelial, nomeada de célula líder (*tip cell*) é selecionada na presença de VEGF, sofrendo regulação da via Notch-Delta (diferenciação celular) (Figura 3A) (CHUNG; LEE; FERRARA, 2010; CARMELIET; JAIN, 2011). As células endoteliais vizinhas não migratórias (células seguidoras – *stalk cells*) proliferam e se diferenciam, alinhando-se para a formação do lúmen tubular, evento que necessita da sinalização de integrinas, as quais participam de um *crosstalk* com os receptores de VEGF (Figura 3B) (PAPETTI; HERMAN, 2002; CLAPP et al., 2009; CHUNG; LEE; FERRARA, 2010; CARMELIET; JAIN, 2011). Interessantemente, as células líderes possuem inúmeros filopódios que as guiam na direção do estímulo angiogênico, enquanto que as células seguidoras liberam fatores proangiogênicos que as auxiliam no alongamento do broto capilar (Figura 3B) (CARMELIET; JAIN, 2011; POTENTE; CARMELIET, 2017; ROHLENOVA et al., 2018). A diferenciação em células líderes e seguidoras é extremamente dinâmica e as células endoteliais competem continuamente pela posição de líder da migração (POTENTE; CARMELIET, 2017).

Durante a fase de maturação e estabilização do novo vaso sanguíneo,

células líderes de brotos capilares adjacentes se conectam, novos componentes da MEC são produzidos e depositados sob a forma de nova lâmina basal e os pericitos migram para o local do vaso neoformado, associando-se intimamente à superfície de células endoteliais falange (estado quiescente; *phalanx cells*), provendo suporte estrutural (Figura 3C) (CHUNG; LEE; FERRARA, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011; POTENTE; CARMELIET, 2017; ROHLENOVA et al., 2018). Concomitantemente, células mielóides são recrutadas e o fluxo sanguíneo é restabelecido, levando ao aumento dos níveis de oxigênio, diminuição da expressão de VEGF e liberação de fatores antiangiogênicos (Figura 3C) (CLAPP et al., 2009; CARMELIET; JAIN, 2011). Por fim, a neovasculatura pode persistir como capilares, diferenciar-se em vênulas ou arteríolas maduras ou sofrer regressão (GRIFFIOEN; MOLEMA, 2000; CARMELIET; JAIN, 2011). Na angiogênese tumoral, a cascata angiogênica é persistente e sem resolução, provida por fatores proangiogênicos secretados pelo tumor num ambiente hipóxico (CHUNG; LEE; FERRARA, 2010).

Figura 3 – A cascata angiogênica



A, Após estimulação por fatores proangiogênicos, as células endoteliais deixam de ser quiescentes e a célula líder é selecionada (VEGF e Notch) para início da formação do broto capilar. A seleção da célula líder necessita da degradação da lâmina basal e da MEC (MMPs), desadesão dos pericitos e perda das junções entre as células endoteliais. O aumento da permeabilidade vascular (VEGF) permite a migração da célula líder. **B**, As células líderes migram na direção do estímulo proangiogênico com o auxílio de seus filopódios e da sinalização das integrinas. As células seguidoras atrás da célula líder proliferam, se alongam e formam o lúmen, e os brotos se fundem para estabelecer uma neovasculatura. Células seguidoras proliferativas atraem pericitos e uma nova lâmina basal começa a ser depositada. Células mielóides são recrutadas. **C**, Após fusão dos brotos vizinhos e da formação do lúmen, ocorre a resolução do estado quiescente do novo vaso formado com a promoção de células falange, restabelecimento de junções aderentes, deposição da lâmina basal e da MEC, maturação dos pericitos e manutenção da vasculatura. Imagem adaptada de CARMELIE; JAIN, *Nature* (2011).

1.2 A REGULAÇÃO DA ANGIOGÊNESE E SUA RELAÇÃO COM AS TERAPIAS ANGIOGÊNICAS

Por ser um processo biológico bastante complexo, a angiogênese é intrinsicamente regulada por vários sistemas de controle positivos e/ou negativos, os quais se alternam ou agem simultaneamente, sendo que a aquisição do fenótipo angiogênico é dependente do balanço local entre fatores pró- e/ou antiangiogênicos denominado de “interruptor angiogênico” (do termo ‘*angiogenic switch*’) (PAPETTI; HERMAN, 2002; OKLU et al., 2010; ZAKRAOUI et al., 2017). É comumente aceito na literatura que o interruptor angiogênico está desligado (*off*) quando os fatores proangiogênicos estão em equilíbrio com os fatores antiangiogênicos, e está ligado (*on*) quando a balança favorece o estímulo proangiogênico (CARMELIET; JAIN, 2000).

Embora a estimulação de fatores proangiogênicos seja necessária para o desencadeamento do processo, o controle por fatores antiangiogênicos também é importante para a precisa continuidade da angiogênese (CAO, 2001; ZUAZO-GAZTELU; CASANOVAS, 2019). Devido a isso, a inibição ou a estimulação da proliferação e da migração de células endoteliais torna-se o ponto crucial para o desenvolvimento de terapias angiogênicas, já que a angiogênese patológica é caracterizada pela proliferação persistente de células endoteliais seguidoras (ZHAO; LI, 2015).

A regulação negativa da angiogênese é um problema que pode levar ao aparecimento de disfunções fisiopatológicas como, por exemplo, lesões isquêmicas. Vários fatores proangiogênicos têm sido estudados para o tratamento de isquemias cardíacas (infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca congestiva), disfunção erétil, reparo tecidual, acidente vascular cerebral e distrofia muscular de Duchenne, doenças onde há a necessidade de formação de novos vasos sanguíneos (RAMOS et al., 2007; SHIMIZU-MOTOHASHI; ASAKURA, 2014; ZHAO; LI, 2015). Já os processos patológicos como inflamação e câncer podem regular de maneira positiva a angiogênese, fazendo com que o acesso aos novos vasos acabe se tornando um fator importante para o desenvolvimento de tumores e metástases, os quais precisam de nutrientes e oxigênio para crescerem (RIBATTI, 2014). Devido a isso, diversos supressores angiogênicos têm sido estudados para o tratamento do câncer,

e na última década tem se focado também no papel da autofagia na supressão da angiogênese tumoral (CARMELIET; JAIN, 2000; FERRARA; KERBEL, 2005; ZHAO; LI, 2015; ZAKRAOUI et al., 2017).

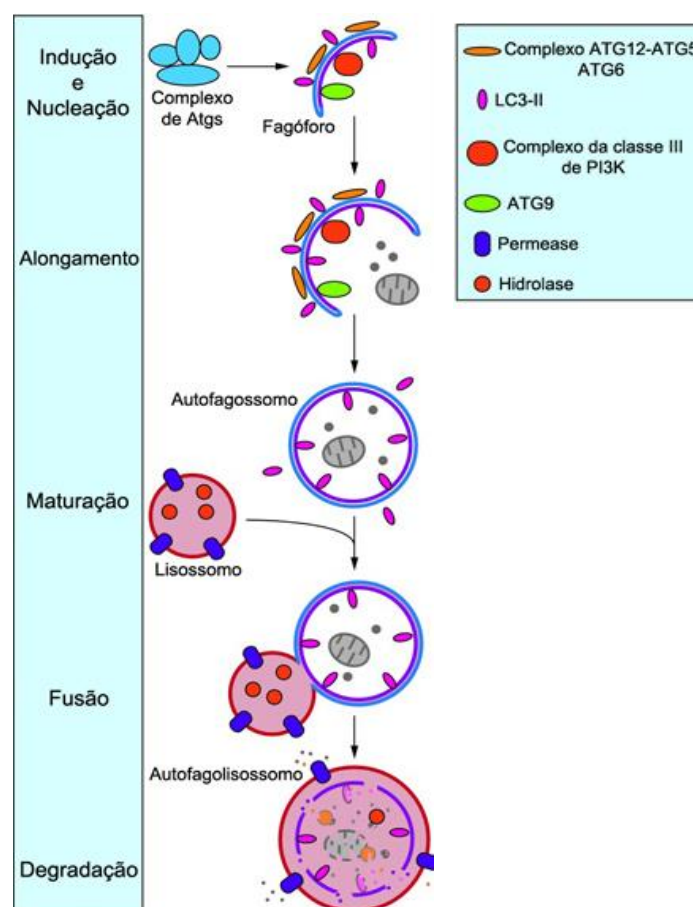
1.2.1 Papel da Autofagia no Tratamento da Angiogênese Tumoral

A autofagia é um mecanismo biológico conservado no qual há a reciclagem de material citoplasmático disfuncional, incluindo proteínas, organelas danificadas e patógenos intracelulares (CHANDRA et al., 2019). Esse material citoplasmático é envolvido por vesículas autofágicas de dupla membrana (autofagossomos), as quais se fundem com o lisossomo (autofagolisossomo), resultando em degradação e reciclagem celular (HASSANPOUR et al., 2018; SCHAAF et al., 2019). Sob condições fisiológicas, a autofagia funciona como um controle de qualidade citoplasmático, mantendo a homeostase celular. Já em condições de estresse (privação de nutrientes e desadesão celular, por exemplo), a autofagia é ativada na tentativa de promover a sobrevivência das células (PARZYCH; KLIONSKY, 2014; HASSANPOUR et al., 2018; SCHAAF et al., 2019; SUNG et al., 2019).

De maneira resumida, a autofagia segue cinco passos básicos: indução, nucleação do fagóforo, alongamento, maturação e fusão (Figura 4) (PARZYCH; KLIONSKY, 2014; HASSANPOUR et al., 2018; CHANDRA et al., 2019). Na indução, sinais de estresse promovem o recrutamento das proteínas relacionadas à autofagia (Atgs), essenciais para a formação do autofagossomo, ao sítio de montagem do fagóforo no retículo endoplasmático (PARZYCH; KLIONSKY, 2014; DIKIC; ELAZAR, 2018; CHANDRA et al., 2019). A seguir, componentes da classe III de PI3K são fosforilados pelo complexo de Atgs, iniciando a nucleação do fagóforo com a ajuda da proteína beclin-1, processo que culmina na formação de uma membrana isolada (CHANDRA et al., 2019). Na terceira etapa, o alongamento do fagóforo é mediado pela cadeia leve 3 da proteína 1 associada à microtúbulos (LC3) em conjunto com Atgs, principalmente a Atg8. Esta proteína se liga ao fagóforo, recrutando componentes da maquinaria autofágica, a qual atrai material que será degradado/reciclado, além de auxiliar no fechamento da membrana do fagóforo (CHANDRA et al., 2019). A membrana que compõe o fagóforo pode ser originada a

partir da membrana plasmática, do retículo endoplasmático, do complexo de Golgi e até mesmo da mitocôndria (PARZYCH; KLIONSKY, 2014). No final deste processo, a membrana envolve seu alvo (carga autofágica) e as duas pontas do fagóforo se fundem, formando uma vesícula de membrana dupla (autofagossomo) (PARZYCH; KLIONSKY, 2014; DIKIC; ELAZAR, 2018). Em seguida, o autofagossomo sofre maturação ao recrutar proteínas essenciais para a sua fusão com o lisossomo, como o complexo receptor de proteínas de ligação solúveis sensíveis à N-etilmaleimida (SNARE) (CHANDRA et al., 2019). Por fim, a membrana externa do autofagossomo se funde com o lisossomo, formando um autofagolisossomo, o qual degrada o corpo autofágico de membrana simples, além do material que foi englobado pelo mesmo, reciclando-o para outras vias celulares (DIKIC; ELAZAR, 2018; HASSANPOUR et al., 2018; CHANDRA et al., 2019).

Figura 4 – Etapas da Autofagia



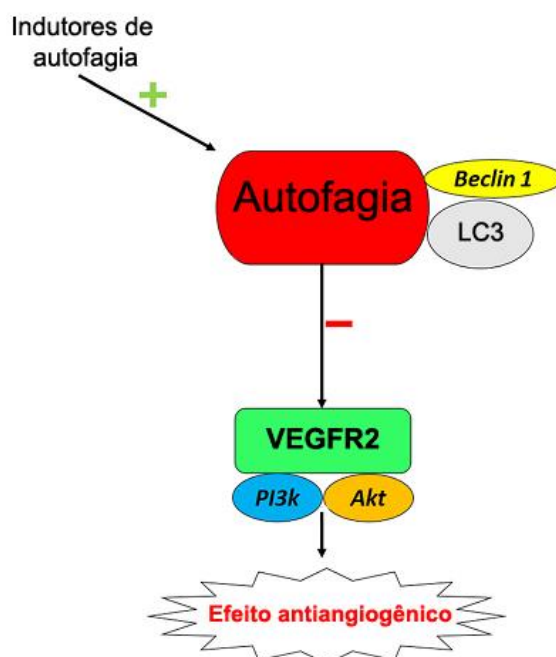
Após indução pelo complexo de Atgs, a nucleação do fagóforo ocorre por meio da fosforilação de componentes da classe III de PI3K. A seguir, se dá o alongamento do fagóforo, o qual é promovido pela LC3 em conjunto com mais um complexo de Atgs, incluindo a Atg8. Eventualmente, as membranas em expansão englobam a carga autofágica. A membrana externa do autofagossomo se funde com a membrana do lisossomo, formando o autofagolisossomo. O conteúdo do

autofagolisossomo é degradado e exportado para o citoplasma para ser reutilizado pela célula (reciclagem). Imagem adaptada de PARZYCH; KLIONSKY, *Antioxidants & Redox Signaling* (2014).

Diversos estudos indicam que o processo autofágico contribui para a supressão do tumor nos estágios iniciais da tumorigênese (QU et al., 2003; ÁVALOS et al., 2014; AMARAVADI; KIMMELMAN; WHITE, 2016; CHANDRA et al., 2019). Mutações monoalélicas no gene autofágico beclin-1 ocorrem em 40% dos cânceres de mama, ovário e próstata humano, e camundongos com perda desse gene têm alta incidência de tumores espontâneos, dados que sugerem um papel de supressor tumoral para a autofagia (QU et al., 2003; ÁVALOS et al., 2014). Além disso, células endoteliais isoladas de camundongos Beclin1+/- apresentaram aumento nos processos de proliferação, migração e tubulogênese quando comparadas às células de camundongos selvagem (WT), indicando que o comprometimento no processo autofágico leva à promoção de angiogênese (SCHAAF et al., 2019).

Muitos agentes antiangiogênicos (sunitinibe e sorafenibe, por exemplo) induzem autofagia e, combinados com indutores autofágicos, têm seus efeitos antiproliferativos e antiangiogênicos acentuados em diversos tipos de câncer, acarretando em supressão tumoral pela inibição da angiogênese (Figura 5) (LIU et al., 2016; SUNG et al., 2019). O indutor autofágico Ery5 teve efeito inibitório na migração e formação de túbulos em HUVECs e estudos sugeriram que a autofagia tem um papel importante na degradação de VEGFR2 e na inibição da via PI3K, prejudicando a cascata angiogênica (KUMAR et al., 2013; HASSANPOUR et al., 2018). Interessantemente, o antiangiogênico endorepeline inibe a angiogênese ao se ligar ao VEGFR2 e à integrina $\alpha_2\beta_1$ e também ao induzir a expressão dos genes autofágicos beclin-1 e LC3, promovendo autofagia (KARDIDEH et al., 2019). Levando em consideração todos os estudos realizados nos últimos anos, podemos concluir que há uma associação entre a autofagia e a angiogênese e que a indução do processo autofágico pode levar à inibição da cascata angiogênica.

Figura 5 – Potencial antiangiogênico da autofagia



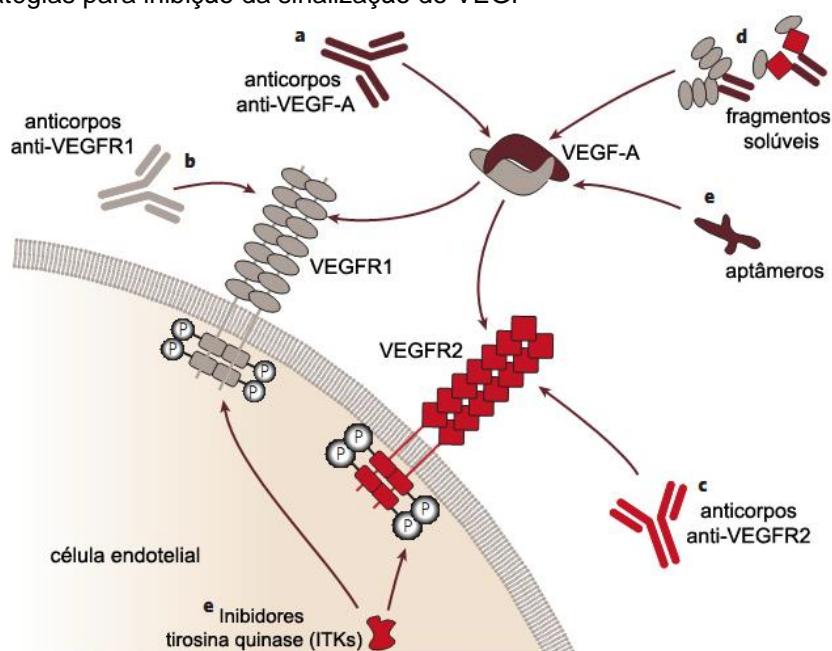
Indutores de autofagia promovem o aumento de beclin-1 e LC3, resultando em efeito inibitório na migração e tubulogênese de HUVECs. Além disso, a autofagia tem papel importante na degradação de VEGFR2 e na inibição da via PI3K/Akt, reduzindo o processo angiogênico. Imagem adaptada de HASSANPOUR et al., *Stem Cell Research & Therapy* (2018).

1.2.2 Fatores Antiangiogênicos

Devido à importância da angiogênese na progressão tumoral, diversos fatores antiangiogênicos têm sido estudados visando o tratamento do câncer. Como o estímulo angiogênico se dá pelo aumento da expressão de VEGF-A pelas células tumorais e circundantes, acarretando em aumento da proliferação e da formação de vasos pelas células endoteliais, inibir o eixo VEGF/VEGFR2 foi foco para construção de diversos agentes antiangiogênicos que pudessem suprimir o processo metastático (FERRARA; ADAMIS, 2016).

Várias estratégias para inibição da sinalização do VEGF foram desenvolvidas e incluem: anticorpos monoclonais tendo como alvo o VEGF-A ou seus receptores (VEGFR1-2); fragmentos solúveis formados pela fusão dos receptores de VEGF, servindo como uma armadilha para impedir a ligação do fator proangiogênico ao seu receptor; aptâmeros que se ligam ao domínio ligante de heparina do VEGF-A₁₆₅ e inibidores tirosina quinase (ITK) que impedem a autofosforilação do VEGFR2 (Figura 6) (CARMELIET; JAIN, 2000; FERRARA; KERBEL, 2005).

Figura 6 – Estratégias para inibição da sinalização do VEGF



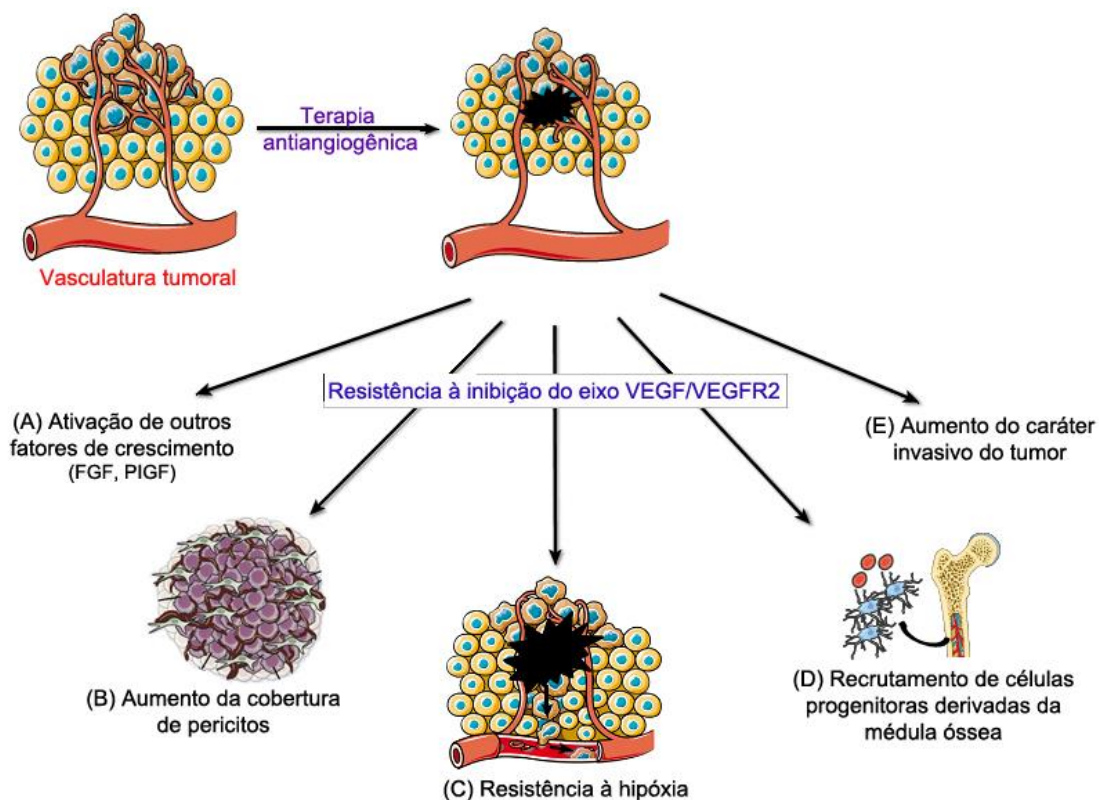
As estratégias incluem (a) anticorpos monoclonais anti-VEGF-A, (b,c) anticorpos bloqueadores dos receptores VEGFR1-2, (d) fragmentos solúveis construídos a partir da fusão dos receptores de VEGF ('armadilha de VEGF'), (e) aptâmeros e inibidores tirosina quinase (ITKs). Imagem adaptada de FERRARA; KERBEL, *Nature* (2005).

Contudo, terapias utilizando o bloqueio do eixo VEGF/VEGFR2 para tratamento do câncer são mais desafiadoras do que parecem e mesmo que o VEGF seja inibido, os tumores conseguem ativar outras vias para compensar este bloqueio (CARMELIET; JAIN, 2000, 2011). Como exemplo, ITKs se mostraram efetivos como monoterapia no tratamento de certos cânceres, mas foram tóxicos quando combinados com quimioterapia (CARMELIET; JAIN, 2011; CHANDRA et al., 2019). Em adição, o anticorpo monoclonal bevacizumabe estimulou a expressão de fatores de crescimento associados ao câncer como o FGF-1 em glioblastomas humanos *in vitro* e, aumentou também a capacidade invasiva dos tumores em modelos *in vivo* utilizando camundongos *nude* (LUCIO-ETEROVIC; PIAO; DE GROOT, 2009; SIMON; GAGLIANO; GIAMAS, 2017).

Em muitos casos clínicos, os tumores desenvolvem resistência à inibição do eixo VEGF/VEGFR2 (RAMJIAWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017; CHANDRA et al., 2019). Estudos indicaram alguns mecanismos para essa resistência: (A) ativação de outros fatores de crescimento (FGF-1, PIGF, angiopoietinas), resultando em tubulogênese; (B) aumento da cobertura de pericitos, os quais passam a nutrir os vasos tumorais; (C) resistência à hipóxia, ajudando as células tumorais a sobreviverem num ambiente sem oxigênio; (D) recrutamento de células progenitoras

derivadas da medula óssea para iniciar a vasculogênese; e (E) aumento do caráter invasivo do tumor, processo mediado pela liberação de MMPs (Figura 7) (SIMON; GAGLIANO; GIAMAS, 2017; APTE; CHEN; FERRARA, 2019; CHANDRA et al., 2019).

Figura 7 – Mecanismos de resistência à inibição do eixo VEGF/VEGFR2



As terapias antiangiogênicas levam à redução da vasculatura tumoral. Entretanto, diversos mecanismos de resistência à inibição do eixo VEGF/VEGFR2 induzem o aumento dos processos angiogênicos. Estes mecanismos são: (A) ativação de outros fatores de crescimento (FGF, PlGF, angiopoietinas); (B) aumento da cobertura de pericitos; (C) resistência à hipóxia; (D) recrutamento de células progenitoras derivadas da medula óssea; e (E) aumento do caráter invasivo do tumor. Imagem adaptada de SIMON; GAGLIANO; GIAMAS, *Trends in Molecular Medicine* (2017).

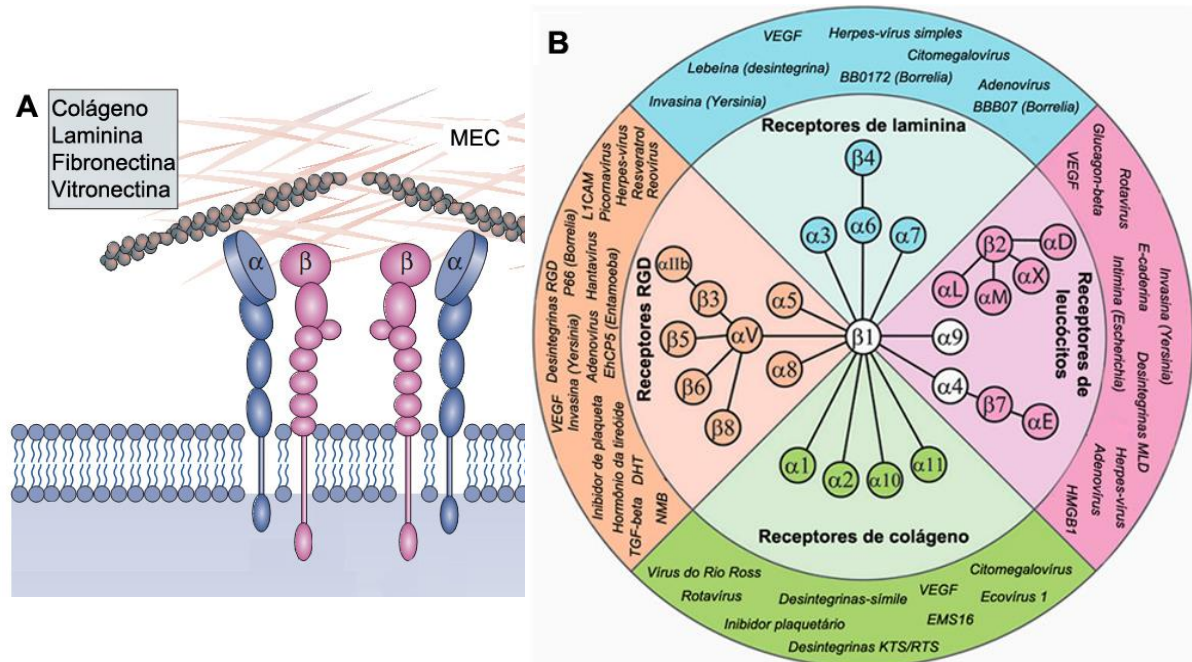
Para combater essa resistência adaptativa dos tumores, outras proteínas e vias angiogênicas devem ser levadas em consideração ao se pensar em terapias antitumoral. Várias moléculas proteicas têm sido descritas como fatores naturais antiangiogênicos, como por exemplo, as desintegrinas e as desintegrinas-símiles (famílias proteicas derivadas de peçonhas de serpentes), as quais inibem a angiogênese via ligação em integrinas (FOLKMAN, 2002; RAMOS et al., 2007; MOMIC et al., 2014; CHUNG et al., 2017).

1.3 INTEGRINAS

Em adição à ativação do receptor VEGFR2, a promoção da angiogênese também depende da participação de outra classe de receptores de superfície, as integrinas, as quais ativam vias de sinalização intracelulares que se cruzam com as desencadeadas pela ativação do eixo VEGF/VEGFR2 (CHEN et al., 2016b; HEITZIG et al., 2017).

As integrinas são uma família de receptores de superfície que englobam glicoproteínas transmembrana heterodiméricas compostas por subunidades α e β que conectam proteínas da MEC, como colágenos, laminina, fibronectina e vitronectina ao citoesqueleto de actina das células (Figura 8A) (SENGER et al., 2002; MAHABELESHWAR et al., 2007; BRIZZI; TARONE; DEFILIPPI, 2012; FRANCESCHI et al., 2015; KRAYEM et al., 2018). Ao todo existem 18 subunidades α e 8 subunidades β que se combinam perfazendo 24 diferentes integrinas (Figura 8B) (AVRAAMIDES; GARMY-SUSINI; VARNER, 2008). Estas glicoproteínas são compostas por um domínio extracelular longo (750-1000 aminoácidos), uma região transmembrana e um domínio citoplasmático curto (20-75 aminoácidos) (SCHNITTERT et al., 2018; ALDAY-PAREJO; STUPP; RÜEGG, 2019). Além de se ligarem aos componentes da MEC, as integrinas também interagem com outras células (via moléculas de adesão intercelular), ligantes solúveis (VEGF, FGF-1, angiopoietinas, TGF- β), proteínas de peçonhas de serpentes, proteínas bacterianas, polissacarídeos fúngicos, vírus e polifenóis (LAFOYA et al., 2018; ALDAY-PAREJO; STUPP; RÜEGG, 2019) (Figura 8B).

Figura 8 – Visão geral das integrinas



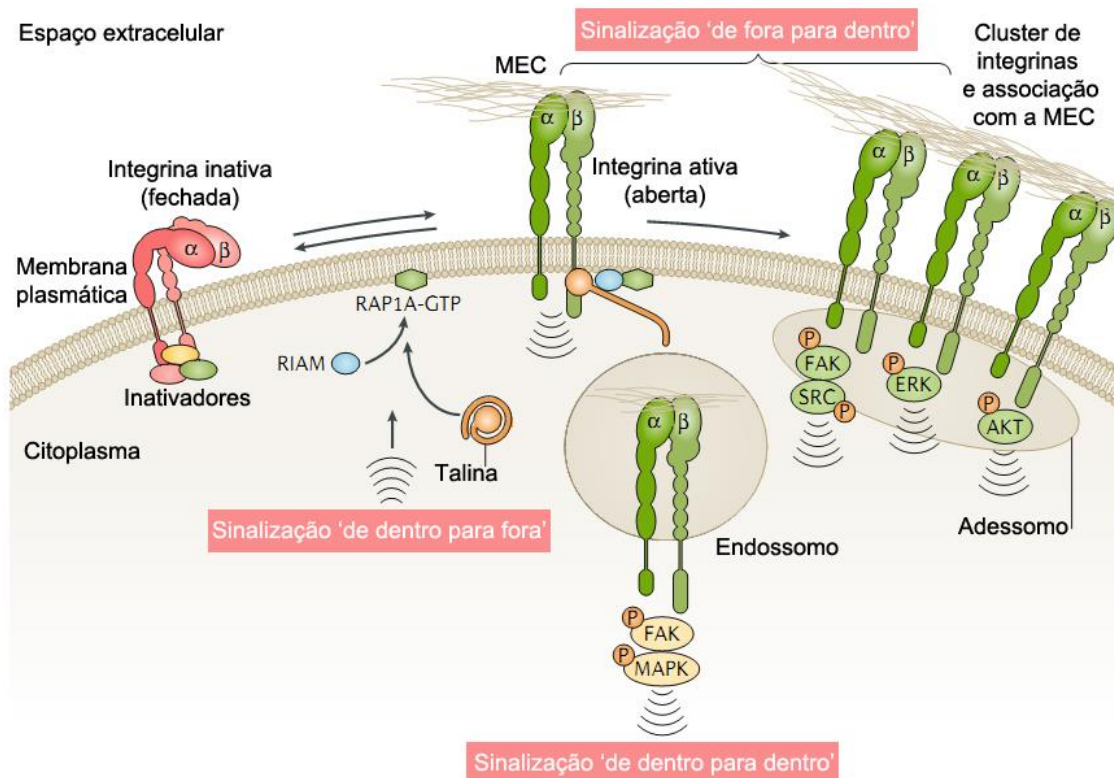
A, Imagem representativa de integrinas, heterodímeros compostos por uma subunidade α e uma subunidade β , que conectam a célula aos componentes da matriz extracelular (MEC) como o colágeno, a laminina, a fibronectina e a vitronectina. Cada subunidade é composta por um domínio extracelular, uma região transmembrana e um domínio intracelular. **B**, Vinte e quatro diferentes integrinas são descritas na literatura. O círculo interno retrata os heterodímeros agrupados em famílias de acordo com seu perfil clássico de ligação à MEC: $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$, $\alpha_{11}\beta_1$ (receptores de colágeno); $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_7\beta_1$ (receptores de laminina); $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_E\beta_7$, $\alpha_D\beta_2$, $\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_X\beta_2$ (receptores de leucócitos) e $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_{11b}\beta_3$ (ligantes de RGD). Os demais ligantes das integrinas estão listados dentro do círculo externo e englobam fatores de crescimento, hormônios, proteínas de peçonhas de serpentes, proteínas bacterianas, polissacarídeos fúngicos, vírus e polifenóis. Imagens adaptadas de AVRAAMIDES; GARMY-SUSINI; VARNER, *Nature Reviews Cancer* (2008) e LAFOYA et al., *International Journal of Molecular Sciences* (2018).

A transdução de sinal das integrinas ocorre de forma bidirecional através da membrana plasmática, acarretando em mudanças conformacionais em suas subunidades α e β , as quais passam de um estado inativo (fechado) para um estado ativo (aberto) (Figura 9) (ALDAY-PAREJO; STUPP; RÜEGG, 2019; PELÁEZ et al., 2019). Dois adaptadores citoplasmáticos, talina e quindlina, em associação com a proteína citoesquelética paxilina, se ligam ao domínio intracelular da subunidade β (sinalização “de dentro para fora” ou *inside-out*), ativando-a e promovendo uma conexão com o citoesqueleto de actina da célula (ALDAY-PAREJO; STUPP; RÜEGG, 2019; BACHMANN et al., 2019). Integrinas ativas têm alta afinidade pelos componentes da MEC, e passam a se associar, formando agrupamentos de integrinas (*clusters*) nas membranas celulares que estabilizam a interação célula-matriz. Como resultado, sinais extracelulares são traduzidos através das integrinas para dentro das células (sinalização de “fora para dentro” ou *outside-in*)

(BACHMANN et al., 2019; JANG; BENINGO, 2019). Essa ativação recruta o adessomo, um complexo contendo inúmeras quinases e proteínas citoesqueléticas, responsáveis pela indução de diversas vias durante as angiogêneses fisiológica e tumoral (Figura 9) (HAMIDI; IVASKA, 2018; PELÁEZ et al., 2019).

A complexa e dinâmica maquinaria associada às integrinas regula a sobrevivência, a proliferação, a migração e a adesão de células endoteliais e tumorais, além dos mecanismos de apoptose e *anoikis* (resistência à morte celular por desadesão) (SEGUIN et al., 2014; CRUZ DA SILVA et al., 2019; KECHAGIA; IVASKA; ROCA-CUSACHS, 2019). Ademais, integrinas ativas são constantemente endocitadas da superfície celular e podem continuar sinalizando de dentro dos endossomos (sinalização “de dentro para dentro” ou *inside-in*) (Figura 9) (HAMIDI; IVASKA, 2018; KECHAGIA; IVASKA; ROCA-CUSACHS, 2019).

Figura 9 – Ativação e sinalização das integrinas



As integrinas apresentam diferentes estados conformacionais: uma forma inativa (fechada) com baixa afinidade por componentes da matriz extracelular (MEC) e uma forma ativa (aberta) com capacidade de transdução de sinais após interação com a MEC. A associação integrina-MEC leva à formação de um *cluster* de integrinas na membrana plasmática das células, recrutando o adessomo (sinalização ‘de fora para dentro’). Integrinas também respondem a sinais ‘de dentro para fora’, no qual GTPases ativam o adaptador citoplasmático talina, o qual se liga à subunidade β da integrina, promovendo uma conexão com o citoesqueleto de actina da célula. Uma terceira sinalização, ‘de dentro para dentro’ ocorre quando as integrinas são endocitadas e continuam sinalizando nos endossomos. Imagem adaptada de HAMIDI; IVASKA, *Nature Reviews Cancer* (2018).

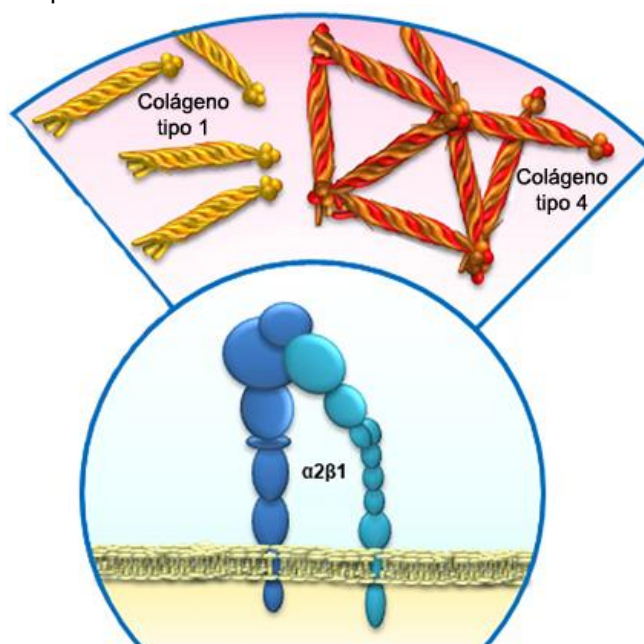
As integrinas regulam não apenas os passos iniciais da cascata angiogênica (proliferação, migração e adesão), mas também as etapas finais do processo, incluindo a tubulogênese e a polaridade das células endoteliais para a formação do lúmen vascular (LIEKENS; DE CLERCQ; NEYTS, 2001). Além disso, elas participam do tráfego endossomal do VEGFR2 (BRIZZI; TARONE; DEFILIPPI, 2012).

Muitas vias reguladas pelas integrinas também são ativadas por receptores de fatores de crescimento como o VEGFR2, indicando a existência de um *crosstalk* integrina/VEGFR2 nas células endoteliais, o qual estimula o processo angiogênico (CARMELIET; JAIN, 2011; ALDAY-PAREJO; STUPP; RÜEGG, 2019). O *crosstalk* mais bem estudado diz respeito ao do receptor angiogênico com a integrina $\alpha_v\beta_3$ (SOMANATH; CIOCEA; BYZOVA, 2009; SOMANATH; MALININ; BYZOVA, 2009). Entretanto, a deleção dos genes α_v e β_3 tiveram pouco impacto no desenvolvimento da angiogênese, suprimindo a angiogênese tumoral apenas quando o tratamento foi realizado antes da implantação de tumores (STERI et al., 2014). Além disso, o cilengtide, peptídeo inibidor da integrina $\alpha_v\beta_3$, estimulou a angiogênese *in vitro*, tendo resposta contrária a esperada (ALDAY-PAREJO; STUPP; RÜEGG, 2019). Devido a estes resultados insatisfatórios, o estudo do *crosstalk* do VEGFR2 com outras integrinas é de fundamental importância e, nesse quesito, a família de integrinas β_1 tem sido um alvo interessante e promissor.

1.3.1 A Família β_1 e a Integrina $\alpha_2\beta_1$

A família de integrinas β_1 contém os principais receptores que medeiam a ligação das células aos colágenos ($\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$ e $\alpha_{11}\beta_1$), considerados os arcabouços ideais para promoção de angiogênese *in vitro* (GHATAK et al., 2016; CHUNG et al., 2017; JANG; BENINGO, 2019). Em particular, a integrina $\alpha_2\beta_1$ é expressa em plaquetas, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, se ligando com alta afinidade ao colágeno tipo 1 (COL1), auxiliando na migração e proliferação de células endoteliais e na formação de vasos, etapas cruciais do processo angiogênico (GHATAK et al., 2016; CHUNG et al., 2017; KRAYEM et al., 2018). Ademais, a $\alpha_2\beta_1$ também pode interagir com o colágeno tipo 4 (COL4), só que com uma menor afinidade (Figura 10) (CASAL; BARTOLOMÉ, 2018).

Figura 10 – A integrina $\alpha_2\beta_1$



A integrina $\alpha_2\beta_1$ se liga com alta afinidade ao colágeno tipo 1, mas também pode interagir com o colágeno tipo 4. Imagem adaptada de CASAL; BARTOLOMÉ, *Biochimica et Biophysica Acta – Reviews on Cancer* (2018).

Expressão elevada da integrina $\alpha_2\beta_1$ tem sido associada ao carcinoma de pele e ao câncer de próstata, e no intestino, altas quantidades de $\alpha_2\beta_1$ são encontradas em células progenitoras em diferenciação (CASAL; BARTOLOMÉ, 2018). A integrina $\alpha_2\beta_1$ foi identificada como a única ligante de COL1 em plaquetas, tendo papel importante na deposição de colágeno em artérias danificadas (HE et al., 2003).

Com relação ao processo angiogênico, sabe-se que a estimulação de células endoteliais pelo VEGF aumenta a expressão da integrina $\alpha_2\beta_1$ com conseguinte ativação de vias de sinalização responsáveis por migração, proliferação celular e tubulogênese (SENGER et al., 2002; SABHERWAL et al., 2006; MACÊDO; FOX; CASTRO, 2015; CHUNG et al., 2017). Altos níveis da subunidade β_1 foram encontrados em amostras de tumores de pacientes resistentes ao bevacizumabe (anticorpo monoclonal bloqueador de VEGF), níveis estes que foram correlacionados à resistência tumoral em terapias antiangiogênicas (JAHANGIRI; AGHI; CARBONELL, 2014). *In vivo*, a expressão da integrina $\alpha_2\beta_1$ foi estimulada pela angiogênese induzida por VEGF, e uma grande quantidade da integrina foi observada em brotos capilares em formação (GHATAK et al., 2016).

Antagonistas da integrina $\alpha_2\beta_1$ drasticamente inibem a angiogênese

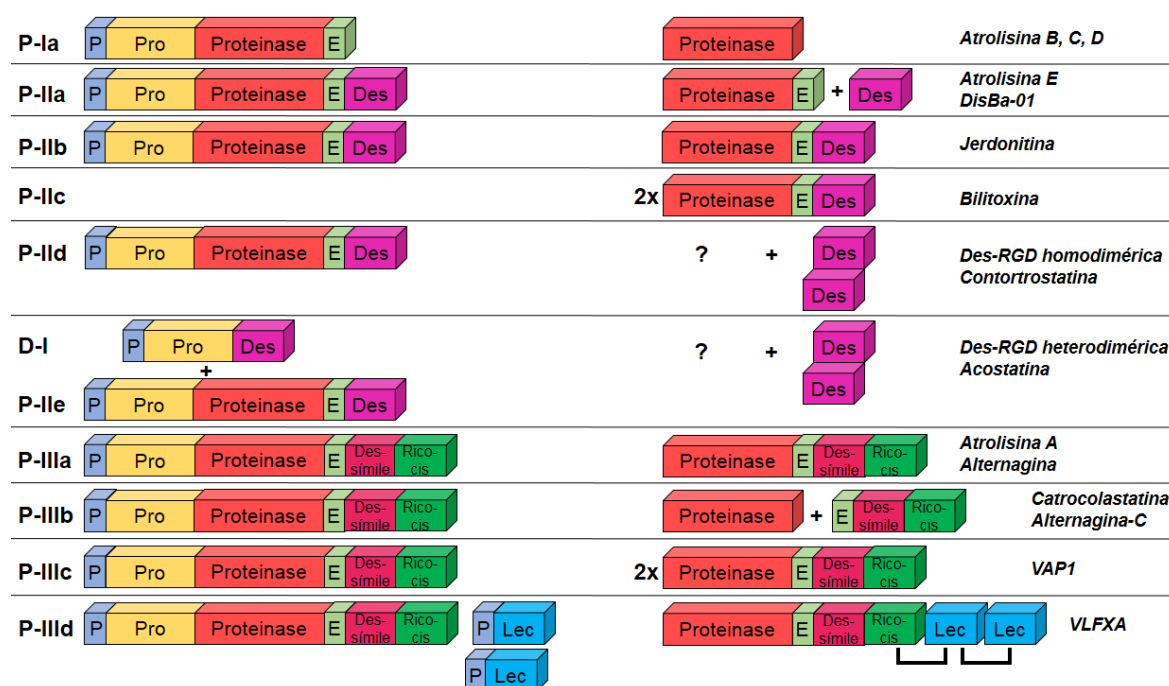
dirigida pelo VEGF, bloqueando o processo metastático, o que evidencia a existência de um 'crosstalk' entre esta integrina e o VEGFR2 (SILVA et al., 2008; WALSH et al., 2012; MACÊDO; FOX; CASTRO, 2015; GHATAK et al., 2016; CHUNG et al., 2017). Anticorpos bloqueadores de $\alpha_2\beta_1$ se mostraram importantes no tratamento da angiogênese tumoral em carcinoma de pele e experimentos *in vitro* demonstraram que a capacidade do VEGF de estimular a via de ERK 1/2 depende dessa integrina (METTOUCHI; MENEGUZZI, 2006). Assim sendo, a utilização de bloqueadores/inibidores da integrina $\alpha_2\beta_1$ representa uma potencial estratégia terapêutica para o tratamento da angiogênese associada ao câncer, dando ênfase ao uso das desintegrinas-símbles advindas de metaloproteinases de peçonhas de serpentes (FOLKMAN, 2002; SABHERWAL et al., 2006; CHUNG et al., 2017; RABELO et al., 2019).

1.4 METALOPROTEINASES DE PEÇONHAS DE SERPENTES (SVMP)

As metaloproteinases de peçonhas de serpente (SVMPs) são enzimas zinco-dependentes, pertencentes à família das reprotinas, que apresentam uma ampla gama de atividades biológicas (inibição de agregação plaquetária, ativação de protrombina e de fator X, além de atividades fibrinogenolítica, fibrinolítica, apoptótica e hemorrágica) (FOX; SERRANO, 2009; DA CUNHA; MARTINS, 2012; HERRERA et al., 2015). Podem ser classificadas em três classes (P-I a P-III) de acordo com seu tamanho (massa molar) e sua organização estrutural (Figura 11) (FOX; SERRANO, 2008, 2009). As SVMPs da classe P-Ia (20-30 kDa) contêm apenas o domínio metaloproteinase após processamento proteolítico da pró-enzima, o qual inclui a sequência conservada de aminoácidos HEXXHXXGXXH ligante de zinco, seguida do motivo "Met-turn" conservado (SANCHEZ et al., 2003; DA SILVA et al., 2012; HERRERA et al., 2015). As enzimas da classe P-II (30-60 kDa; subclasses P-IIa, P-IIb, P-IIc, P-IId e P-IIe) contêm o domínio metaloproteinase seguido de um domínio desintegrina adicional, o qual apresenta a sequência adesiva X/RGD (variável/arginina-glicina-aspartato) e pode ser liberado após processamento da forma precursora (FOX; SERRANO, 2008; DA SILVA et al., 2012; HERRERA et al., 2015). Já as SVMPs da classe P-III (60-100 kDa; subclasses P-IIIa, P-IIIb e P-IIIc) englobam proteínas com o domínio metaloproteinase seguido de um domínio

desintegrina-símile contendo a sequência adesiva D/ECD (aspartato/glutamato-cisteína-aspartato), e um domínio rico em cisteína (FOX; SERRANO, 2008; MARKLAND; SWENSON, 2013). A subclasse P-III_d contém enzimas com a estrutura padrão de uma P-III e dois domínios adicionais tipo lectina-C conectados por pontes dissulfeto (FOX; SERRANO, 2008; TERRA et al., 2009). O processamento proteolítico da classe P-III libera os domínios desintegrina-símile e rico em cisteína (fragmentos DC) (HERRERA et al., 2015). Os pró-domínios existentes em todas as formas precursoras das SVMPs estão associados com o estado latente das enzimas durante sua maturação (Figura 11) (TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012).

Figura 11 - Classificação das metaloproteinases de peçonhas de serpentes (SVMPs)



As SVMPs podem ser classificadas em três classes: P-I (20-30 kDa) contendo apenas o domínio metaloproteinase após processamento proteolítico, P-II (30-60 kDa) contendo o domínio metaloproteinase e um domínio desintegrina adicional (X/RGD) que pode ser liberado após processamento da forma precursora e P-III (60-100 kDa) englobando proteínas com o domínio metaloproteinase seguido de um domínio desintegrina-símile (D/ECD) e um domínio rico em cisteína. O processamento da classe P-III libera fragmentos DC (desintegrina-símile/rico em cisteína). Os pontos de interrogação na figura indicam que o produto processado não foi identificado na peçonha. P = predomínio; Pro = pró-domínio; E = espaçador; Des = desintegrina; Des-símile = desintegrina-símile; Rico-cis = rico em cisteína; Lec = lectina. Imagem adaptada de FOX; SERRANO, *The FEBS Journal* (2008).

As SVMPs induzem principalmente hemorragia local e sistêmica ao afetarem diretamente as células endoteliais e suas interações com proteínas da MEC (fibronectina, laminina, COL1 e COL4) (TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012;

MARKLAND; SWENSON, 2013; GUTIÉRREZ et al., 2016). Além disso, elas causam mio- e dermonecrose, edema, coagulopatias e rompimento da lâmina basal celular, sendo consideradas proteínas pró-inflamatórias que possuem atividade fibrin(ogen)olítica e apoptótica (DE AVILA et al., 2011; DE MORAIS et al., 2013; MARKLAND; SWENSON, 2013; GUTIÉRREZ et al., 2016). A maioria das peçonhas de serpentes viperídeas (família Viperidae) é composta por pelo menos 30% de metaloproteinases, indicando a grande importância dessa família proteica durante o envenenamento ofídico (TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012; DE PAULA et al., 2014).

1.5 DESINTEGRINAS

As desintegrinas são uma família de proteínas pequenas, não enzimáticas e ricas em cisteínas, derivadas do processamento proteolítico de P-II SVMPs (TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012; MACÊDO; FOX; CASTRO, 2015). Elas modulam os processos de adesão e migração celular, apoptose, agregação plaquetária e angiogênese, e apresentam em sua estrutura uma alça saliente na porção C-terminal com uma sequência tripeptídica conservada que interage no sítio de ligação das integrinas, bloqueando as funções destes receptores transmembrana, agindo como potentes antagonistas (CESAR et al., 2018; LAZAROVICI; MARCINKIEWICZ; LELKES, 2019).

Atualmente, as desintegrinas podem ser divididas em quatro grupos de acordo com seu tamanho e número de pontes dissulfeto: (a) desintegrinas pequenas (41-51 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto); (b) desintegrinas médias (~70 resíduos de aminoácidos e seis pontes dissulfeto); (c) desintegrinas grandes (84 resíduos de aminoácidos e sete pontes dissulfeto) e (d) desintegrinas homo e heterodiméricas (~67 resíduos de aminoácidos e seis pontes dissulfeto (CALVETE et al., 2003; CESAR et al., 2018; LAZAROVICI; MARCINKIEWICZ; LELKES, 2019). Funcionalmente, elas são divididas em três grupos de acordo com as integrinas pelas quais têm afinidade e pela presença de motivos ativos específicos: (a) desintegrinas monoméricas que contém o motivo RGD ou similares (KGD, MVD, MGD e WGD) e interagem com as integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_8\beta_1$; (b) desintegrinas heterodiméricas com motivo MLD e similares

(LDV e LEV) que interagem com as integrinas $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_D\beta_2$, $\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$ e $\alpha_X\beta_2$; e (c) desintegrinas pequenas com motivo R/KTS, potentes inibidores seletivos da integrina $\alpha_1\beta_1$ (ANGULO et al., 2014; MACÊDO; FOX; CASTRO, 2015). Os aminoácidos adjacentes ao motivo tripeptídico e a posição das pontes dissulfeto são fatores que determinam a conformação e a afinidade das desintegrinas por seus ligantes (ANGULO et al., 2014).

Estudos demonstraram que as desintegrinas têm a capacidade de inibir a adesão de células tumorais aos diversos componentes da MEC, tendo efeitos antitumorais e antiangiogênicos promissores e com uma ampla gama de aplicações terapêuticas (TRIKHA et al., 1994; YANG et al., 2005). Como exemplos, temos: a desintegrina recombinante salmosina (*Agkistrodon halys brevicaudus*) que inibiu a angiogênese no modelo de membrana corioalantóica de ovo de galinha (KANG; LEE; KIM, 1999); a acutina (*Agkistrodon acutus*) que inibiu a adesão de células endoteliais aos componentes da MEC e diminuiu a formação de túbulos *in vitro* (YEH; PENG; HUANG, 1998); a desintegrina homodimérica contortrostatina (*Agkistrodon contortrix*) que inibiu a invasão de células tumorais e endoteliais *in vitro*, interrompendo a angiogênese induzida por FGF-1 e VEGF (SWENSON et al., 2005); a desintegrina quimérica vicrostatina (junção da parte C-terminal da desintegrina equistatina com a sequência da desintegrina contortrostatina) que interferiu na invasão de células endoteliais e na tubulogênese (MINEA et al., 2010), e a desintegrina recombinante DisBa-01 (*Bothrops alternatus*) que diminuiu a expressão de VEGF e de seus receptores VEGFR1-2 em células HMEC-1 e interferiu no *crosstalk* $\alpha_v\beta_3$ /VEGFR2 em HUVECs, suprimindo o processo angiogênico (MONTENEGRO et al., 2012; DANILUCCI et al., 2019).

1.6 DESINTEGRINAS-SÍMILE

As desintegrinas-símile presentes em peçonhas de serpentes são pequenas proteínas ricas em cisteínas que não possuem atividade enzimática e são obtidas a partir do processamento proteolítico de P-III SVMPs (MACÊDO; FOX; CASTRO, 2015). Elas contêm o motivo tripeptídico conservado D/ECD que se liga especificamente à integrina $\alpha_2\beta_1$, inibindo sua interação com o COL1 e consequentemente interferindo nos processos de adesão, proliferação e migração

celular (SELISTRE-DE-ARAUJO et al., 2005; FOX; SERRANO, 2008; MACÊDO; FOX; CASTRO, 2015). O termo 'desintegrina-símile' é utilizado para diferenciar este tipo de proteína das desintegrinas derivadas do processamento de P-II SVMPs, as quais possuem os motivos tripeptídicos RGD, KGD, WGD, VGD, MGD, RTS e KTS (descrição no item 1.5) (LU et al., 2005).

Estudos utilizando anticorpos monoclonais bloqueadores dos domínios desintegrina-símile/rico em cisteína (domínios DC) mostraram que a P-III SVMP jararagina (*Bothrops jararaca*) se liga à integrina $\alpha_2\beta_1$ por meio de uma região hipervariável C-terminal contida em seu domínio rico em cisteína, enquanto que um motivo específico dentro do domínio desintegrina-símile é responsável por sua ligação ao COL1 da MEC e pela maior parte de suas atividades biológicas (TANJONI et al., 2003, 2010; MOURA-DA-SILVA et al., 2008). Já o estudo cristalográfico da P-III SVMP bothropasina (*Bothrops jararaca*) mostrou, por meio de sua estrutura cristalográfica, que seu domínio desintegrina-símile se liga à integrina $\alpha_2\beta_1$, enquanto que o seu domínio rico em cisteína reconhece proteínas alvo como o COL1 (MUNIZ et al., 2008).

É interessante ressaltar, que a interação de desintegrinas-símile com a integrina $\alpha_2\beta_1$ pode promover uma resposta antagonista, com o bloqueio das funções da integrina, ou até mesmo uma resposta agonista, com a indução de vias de sinalização mediadas pelos receptores transmembrana (MOURA-DA-SILVA; BUTERA; TANJONI, 2007). A alternagina-C, proteína utilizada neste trabalho, é uma desintegrina-símile P-IIIb que foi descrita pela primeira vez em 2000 por Souza e colaboradores (SOUZA et al., 2000).

1.6.1 Alternagina-C (ALT-C)

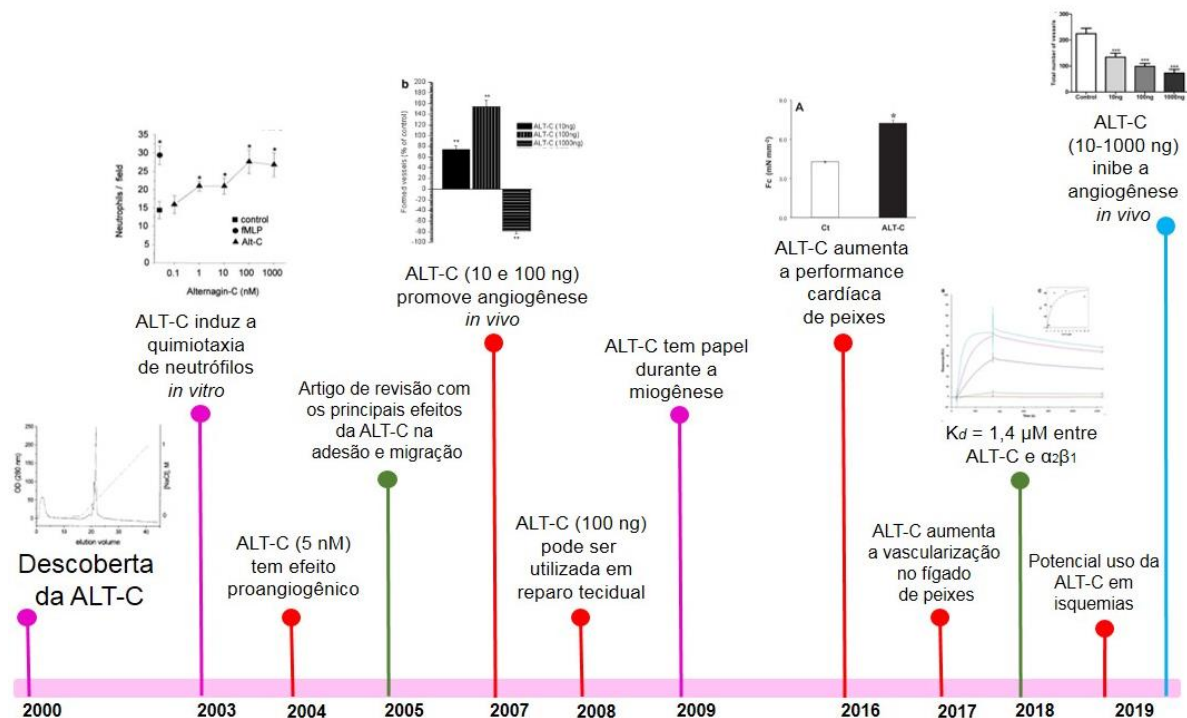
A Alternagina-C (ALT-C) é uma proteína desintegrina-símile, rica em cisteína, com massa molecular de 29 kDa e sequência adesiva ECD (SOUZA et al., 2000). Ela é obtida a partir da purificação proteica da peçonha da serpente *Bothrops alternatus* (popularmente conhecida como urutu), espécie que pode ser encontrada no Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina (OHLER et al., 2010; NOGUEIRA JÚNIOR et al., 2019).

A ALT-C é sintetizada como uma forma precursora (alternagina, uma

SVMP da classe P-III) contendo um domínio metaloproteinase, o qual é liberado após processamento proteolítico, obtendo-se assim uma proteína com apenas os domínios desintegrina-símile e rico em cisteína (proteína DC) (SOUZA et al., 2000). Ela é capaz de se ligar à integrina $\alpha_2\beta_1$, inibindo a adesão de células saudáveis e tumorais ao COL1 da matriz extracelular (SELISTRE-DE-ARAUJO et al., 2005). A constante de dissociação da ALT-C em relação à $\alpha_2\beta_1$ ($K_d = 1,4 \mu\text{M}$) foi determinada por ensaio de ressonância plasmônica de superfície e confirmou a interação entre a proteína e essa integrina (MORITZ et al., 2018).

A figura 12 indica os principais resultados obtidos com a ALT-C até o presente momento (2000-2019), incluindo diversos trabalhos promovidos pelo nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular – LBBM), os quais elucidam o importante papel desta desintegrina-símile nos processos de adesão, migração, quimiotaxia, angiogênese, vascularização e miogênese.

Figura 12 – Linha do tempo da ALT-C



2000: descoberta da desintegrina-símile ALT-C, a qual foi purificada da peçonha da serpente *Bothrops alternatus* (SOUZA et al., 2000); **2003:** estudo mostrando a indução de neutrófilos humanos pela ALT-C (*in vitro*) (MARIANO-OLIVEIRA et al., 2003); **2004:** ALT-C (5 nM) tem efeito proangiogênico (COMINETTI et al., 2004); **2005:** artigo de revisão da ALT-C mostrando suas propriedades na inibição da adesão de células saudáveis e tumorais ao COL1 da MEC ao inibir a integrina $\alpha_2\beta_1$ (SELISTRE-DE-ARAUJO et al., 2005); **2007:** modelo de plugue de matrigel em camundongos *nude* mostrou que a ALT-C (10-100 ng) promove a angiogênese (RAMOS et al., 2007); **2008:** ALT-C (100 ng) tem potencial no reparo tecidual (*in vivo*) (SANT'ANA et al., 2008); **2009:** ALT-C aumenta a viabilidade de mioblastos murinos, tendo papel durante a miogênese (MESQUITA-FERRARI et al., 2009); **2016:** ALT-C (0,5 mg/kg) promove melhoras na performance cardíaca de

peixes (*in vitro*) (MONTEIRO et al., 2016); **2017**: ALT-C (0,5 mg/kg) aumenta a vascularização no fígado de peixes (*in vitro*) (MONTEIRO et al., 2017); **2018**: a constante de dissociação da ALT-C em relação à integrina $\alpha_2\beta_1$ ($K_d = 1,4 \mu\text{M}$) mostrou sua alta afinidade pela integrina (MORITZ et al., 2018); **2019**: ALT-C tem potencial uso no tratamento de disfunção contrátil cardíaca e isquemias (MONTEIRO et al., 2019); **2019**: ALT-C (10-1000 ng) inibiu a angiogênese e a resposta inflamatória *in vivo* (RABELO et al., 2019).

Estudos quimiotáticos e imunocitoquímicos mostraram que a ALT-C (100 nM) induz a quimiotaxia de neutrófilos humanos *in vitro*, promovendo o aumento da fosforilação de FAK e de PI3K associada (MARIANO-OLIVEIRA et al., 2003). A FAK fosforilada ativa a transdução de sinal da integrina $\alpha_2\beta_1$, culminando num aumento do conteúdo de actina-F, indicando um papel agonista da desintegrina-símile (MARIANO-OLIVEIRA et al., 2003). Tratamentos com 50 a 100 nM da proteína também foram capazes de aumentar a viabilidade de mioblastos murinos após 48 horas de incubação, sugerindo um papel de importância para a desintegrina-símile durante a miogênese (MESQUITA-FERRARI et al., 2009). Além disso, a ALT-C modula a angiogênese de maneira dose-dependente *in vitro* e *in vivo*, tendo efeitos pró- e antiangiogênicos em baixas e altas concentrações, respectivamente (COMINETTI et al., 2004; RAMOS et al., 2007; SANT'ANA et al., 2008).

ALT-C (5 nM) aumentou a expressão gênica do proangiogênico VEGF em fibroblastos humanos, além de promover a proliferação de HUVECs e ativar a fosforilação da via Akt/PKB (quinase serina-treonina/proteína quinase B) envolvida na promoção de angiogênese (COMINETTI et al., 2004). Em modelo de plugue de matrigel em camundongos *nude*, ALT-C (10 e 100 ng) induziu a migração de células endoteliais assim como a formação de novos vasos, além de aumentar a expressão gênica de VEGFR2 após 48 horas na concentração de 10 nM (RAMOS et al., 2007). O mesmo estudo mostrou que a desintegrina-símile na concentração de 1000 ng tem efeito oposto, inibindo a migração de células endoteliais e a formação de vasos, possuindo potente resposta antiangiogênica (RAMOS et al., 2007). Já em modelo de lesão tecidual em pele de ratos machos *Wistar*, ALT-C (60 e 100 ng) aumentou tanto as densidades de fibroblastos e de vasos sanguíneos quanto os níveis proteicos de VEGF, além de promover a deposição de COL1, acelerando o processo inflamatório, resultados que indicam que a desintegrina-símile pode ser utilizada em tratamentos de reparo tecidual (SANT'ANA et al., 2008, 2011).

Estudos com peixes *Hoplias malabaricus* (traíra) mostraram que a ALT-C (dose de 0,5 mg/kg; via intra-arterial) promove melhoras na performance cardíaca *in*

in vitro ao aumentar os níveis de VEGF do miocárdio, além de estimular a angiogênese cardíaca em condições de hipóxia (3% de O₂) sem deposição de colágeno ou presença de fibrose, dados que sugerem a aplicação da proteína em terapias voltadas para o tratamento de disfunção contrátil cardíaca e isquemias (MONTEIRO et al., 2016, 2019). Estudo posterior utilizando o mesmo modelo animal e mesmas condições experimentais ressaltou que a ALT-C também é capaz de aumentar a vascularização no fígado ao elevar a produção de VEGF neste órgão (MONTEIRO et al., 2017). O tratamento com a desintegrina-símile promoveu uma melhora na atividade de enzimas hepáticas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase) quando comparado ao grupo controle, diminuindo o dano oxidativo no fígado das traíras (MONTEIRO et al., 2017).

Com relação aos efeitos antiangiogênicos da ALT-C, estudos mostraram que a desintegrina-símile é capaz de interferir na promoção de angiogênese tanto *in vitro* quanto *in vivo*. ALT-C (10, 100 e 1000 nM) diminuiu os níveis proteicos de MMP-2 (metaloproteinase de matriz 2) em células endoteliais microvasculares humanas (HMEC-1), interferindo no processo angiogênico já que esta metaloproteinase de matriz está intimamente envolvida na formação de novos vasos sanguíneos (MORITZ et al., 2018). *In vivo*, a ALT-C (10, 100 e 1000 ng) inibiu tanto a angiogênese quanto a resposta inflamatória induzida por discos de esponjas inseridos na região dorsal de camundongos *balb/c* (RABELO et al., 2019). A desintegrina-símile foi capaz de reduzir o conteúdo de hemoglobina, o número de mastócitos e de vasos sanguíneos nas esponjas, além das concentrações de VEGF e FGF-1 (RABELO et al., 2019).

Contudo, apesar destes resultados prévios, o mecanismo de ação da ALT-C em células endoteliais e nas vias ativas durante a angiogênese não foi totalmente abordado. Assim sendo, o presente trabalho visa avaliar o efeito antiangiogênico da ALT-C após inibição da integrina $\alpha_2\beta_1$ e sua interferência no *crosstalk* $\alpha_2\beta_1$ /VEGFR2.

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESE

A inibição da integrina $\alpha_2\beta_1$ pela ALT-C (1000 nM) pode interferir no *crosstalk* da integrina com o receptor VEGFR2, abolindo a angiogênese.

2.2 OBJETIVO GERAL

Estudar os mecanismos moleculares da ação antiangiogênica da ALT-C em células endoteliais humanas.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção da desintegrina-símile ALT-C altamente purificada por meio de técnicas cromatográficas.
- Verificar as possíveis mudanças morfológicas promovidas pela ação antiangiogênica da ALT-C em células endoteliais humanas utilizando-se de microscopia de fluorescência.
- Analisar a adesão, a viabilidade, a migração e a tubulogênese sob estimulação do VEGF e tratamento com ALT-C.
- Avaliar os efeitos da ALT-C no conteúdo proteico de $\alpha_2\beta_1$ e VEGFR2 em células endoteliais humanas.
- Avaliar os efeitos da ALT-C na fosforilação de $\alpha_2\beta_1$ e VEGFR2 em células endoteliais humanas.
- Analisar as principais vias de sinalização angiogênicas (ERK 1/2, PI3K, FAK-Src e paxilina) na presença de ALT-C e de VEGF.
- Avaliar os efeitos da ALT-C no conteúdo proteico de marcadores autofágicos (LC3B e Beclin-1) na presença de VEGF.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA ALT-C

A ALT-C, o domínio desintegrina-símile processado da SVMP alternagina, foi purificada da peçonha da serpente *Bothrops alternatus* (lote 02/06 doado pelo Instituto Butantan; 3361,9 mg) por meio de dois passos cromatográficos de exclusão molecular (coluna Hiloal[®] 16/600 Superdex[®] 200 pg; GE Healthcare, Chicago, IL, EUA) seguidos por uma cromatografia de troca aniônica (coluna Mono Q[®] 5/50 GL; GE Healthcare) como descrito previamente (SOUZA et al., 2000). A quantificação proteica foi realizada por método do ácido bicinonínico (BCA) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (*PierceTM BCA Protein Assay*; Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A atividade biológica da ALT-C foi determinada através de ensaio de inibição da adesão celular ao COL1 utilizando-se de células humanas eritroleucêmicas K-562 transfectadas com a integrina $\alpha_2\beta_1$ de acordo com Souza e colaboradores (SOUZA et al., 2000).

3.2 VERIFICAÇÃO DA PUREZA DA ALT-C POR ENSAIO DE ZIMOGRAFIA

A zimografia consiste em um método sensível para medida de atividade enzimática após eletroforese proteica. Essa atividade é determinada pelo nível de degradação do substrato copolimerizado no gel, no caso a gelatina (G8150-500G; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Alíquotas da ALT-C purificada (duplicata, 20 μ g cada) foram resolvidas em gel de poliacrilamida 10% contendo 0,1% de gelatina. Alíquotas dos picos da cromatografia em gel filtração contendo proteases foram utilizadas como controle positivo do ensaio. O gel foi lavado duas vezes com 2,5% de Triton X-100 (20 minutos cada) e incubado por 18 horas em tampão de Tris 50 mM (pH 8) acrescido de 5 mM de CaCl_2 , 0,02% de NaN_3 e 10 mM de ZnCl_2 . No dia seguinte, o gel foi corado com azul de *Coomassie* e descorado com solução de ácido acético e metanol em água (1:4:5), revelando as bandas cuja intensidade está relacionada com a quantidade de substrato degradado na reação de proteólise. No ensaio realizado, espera-se a ausência de bandas nas alíquotas da ALT-C, indicativo da eficiência da purificação da desintegrina-símile.

3.3 MARCAÇÃO DA ALT-C COM O FLUORÓFORO ALEXA FLUOR®-546

Para realização dos experimentos de co-localização e de adesão de HUVECs à diferentes proteínas da matriz extracelular, a ALT-C purificada foi marcada com o fluoróforo Alexa Fluor®-546 (A2002; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) diluído em N,N-Dimetilformamida livre de íons (DMF), seguindo instruções do fabricante (Invitrogen). Brevemente, 500 µg de ALT-C foram microdialisados em tampão de bicarbonato de sódio 0,1 M (pH 8,4) por 30 minutos e incubados com 5 µL de fluoróforo Alexa Fluor® 546 (A2002; Invitrogen) por 1 hora em agitação no escuro (temperatura ambiente). O excesso de fluoróforo foi removido por meio de purificação cromatográfica utilizando-se coluna de gel filtração Sephadex G-25 (17003301; GE Healthcare) previamente equilibrada com solução tampão fosfato (PBS, *phosphate buffer solution*). A concentração de ALT-C marcada com Alexa Fluor®-546 foi determinada no espectrofotômetro *SpectraMax I3x* (absorbância 280 nm; Molecular Devices, San José, CA, EUA) utilizando-se o protocolo de leitura 'Endpoint' do *software Softmax Pro* (versão 6.4). Posteriormente foi realizado o seguinte cálculo para correção da contribuição do fluoróforo na absorbância da proteína (em mg/mL):

$$[\text{ALT-C marcada}] = A_{\text{máximo}} \times A_{280} / \text{Fator de Correção (FC)}_{\text{máximo}}$$

Sendo,

$$A_{\text{máximo}} = 1 \text{ mg/mL}$$

$$A_{280} = \text{Absorbância lida} - \text{FC do fluoróforo (0,12 unidades para Alexa Fluor®-546)}$$

$$\text{FC}_{\text{máximo}} = 1,4 \text{ unidades para 1 mg/mL de proteína}$$

Em seguida, calculou-se a molaridade da desintegrina-símile por meio da fórmula a seguir:

$$C_{\text{ALT-C}} = m / \text{MM} \times V$$

Onde,

$$C_{\text{ALT-C}} = \text{Concentração Molar da proteína}$$

$$m = \text{massa em gramas (g)}$$

$$\text{MM} = \text{massa molecular da proteína em Daltons (Da)}$$

$$V = \text{volume em litro (L)}$$

Para verificação da marcação da ALT-C, HUVECs (5×10^3 /poço) foram plaqueadas em placas pretas (fundo transparente) de 96 poços (Greiner Bio-one®) recobertas com uma fina camada de COL1 ($1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; BD Biosciences) em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) contendo soro fetal bovino a 10% (FBS, *fetal bovine serum*; Nutricell, Campinas, SP, Brasil) e incubadas *overnight* a 37°C , 5% CO_2 . No dia seguinte, as células foram tratadas por 15 minutos com 1000 nM de ALT-C marcada com Alexa Fluor®-546 e fixadas por 10 minutos com 4% de paraformaldeído. Os núcleos celulares foram marcados com o fluoróforo 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI; Thermo Scientific) por 10 minutos. Fotos foram obtidas por meio do microscópio *ImageXpress XLS System* (Molecular Devices) em aumento de 60x. O tempo de tratamento de 15 minutos com a ALT-C-AlexaFluor®-546 foi baseado em experimentos prévios utilizando células HeLa (carcinoma de ovário humano) (dados não publicados pelo grupo de pesquisa LBBM).

3.4 CULTURA CELULAR

Células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC), obtidas da ATCC (*American Type Culture Collection*, ATCC® CRL-1730, Manassas, VA, EUA), foram cultivadas em meio DMEM (Vitrocell) suplementado com 10% de FBS (Nutricell), estreptomicina (10 mg/mL; Vitrocell) e penicilina (10000 U.I./mL; Vitrocell) e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 até confluência. As células foram utilizadas entre as passagens 7 e 18 e subculturas foram obtidas por tratamento com tripsina. Células humanas eritroleucêmicas K-562 transfectadas com a integrina $\alpha_2\beta_1$ foram cultivadas em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI; Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de FBS (Nutricell), L-glutamina (Sigma-Aldrich), estreptomicina (10 mg/mL; Vitrocell), penicilina (10000 U.I./mL; Vitrocell) e geneticina (Sigma-Aldrich) e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 até confluência. A contagem das células foi realizada antes dos experimentos para checagem da viabilidade celular por meio de um contador automático de células (TC20; Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) utilizando-se o corante azul de tripano (*trypan blue*) na concentração de 0,4% seguindo protocolo fornecido pelo fabricante (Thermo Scientific).

3.5 CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo foi realizada para a determinação do perfil das integrinas α_2 e β_1 na superfície celular de HUVECs, seguindo protocolo preestabelecido pelo grupo de pesquisa LBBM. As células (1×10^6 /poço) foram incubadas por 1 hora a 4 °C com 1 μ g de anticorpos primários anti-integrina α_2 (*PE Mouse anti-human CD49b 555669*; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) e anti-integrina β_1 (*P5D2 Mouse monoclonal 13590*, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA), lavadas com PBS e incubadas por 45 minutos a 4 °C no escuro com 1,5 μ L de anticorpo secundário conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, *fluorescein isothiocyanate*, BD Biosciences). As HUVECs foram novamente lavadas com PBS, centrifugadas por 7 minutos a 1500 rpm (rotações por minuto) e imediatamente analisadas em citômetro de fluxo *Accuri™ C6* (BD Biosciences).

3.6 ENSAIO DE MORFOLOGIA CELULAR

Mudanças morfológicas na linhagem HUVEC, promovidas pelo bloqueio da integrina $\alpha_2\beta_1$ pela ALT-C, foram visualizadas por meio de ensaio de fluorescência. As células (8×10^3 /poço) foram diluídas em DMEM suplementado com 10% de FBS e plaqueadas em placas pretas (fundo transparente) de 96 poços (Greiner Bio-one®, Monroe, NC, EUA) previamente recobertas com COL1 (1,5 μ g/cm²; BD Biosciences). No dia seguinte, as HUVECs foram tratadas com ALT-C (1000 nM), VEGF (10 ng/mL; Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA) ou ambos em DMEM suplementado com 0,5% de FBS seguindo períodos de incubação de 1 e 24 horas em incubador a 37 °C, 5% CO₂. Posteriormente, as células foram fixadas por 10 minutos com 4% de paraformaldeído, permeabilizadas por 5 minutos com 0,3% de Triton X-100 e bloqueadas com 2% de albumina de soro bovino (BSA, *bovine serum albumin*) em PBS por 30 minutos. Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (Thermo Scientific) e os citoesqueletos com o fluoróforo faloidina conjugado com Alexa Fluor®-488 (A12379, Thermo Scientific) por 10 minutos. Imagens de todos os grupos foram obtidas por meio do microscópio *ImageXpress XLS System* (Molecular Devices, San José, CA, EUA) em aumento de 60x. Cinco sítios por grupo foram escolhidos aleatoriamente para contagem do número de filopódios das células utilizando-se o *software* ImageJ Fiji (versão 1.52g). As HUVECs também foram

tratadas com 10 e 100 nM de ALT-C e com o anticorpo bloqueador da integrina $\alpha_2\beta_1$ [P1E6] (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ab24697; Abcam) por 1 hora e os ensaios morfológicos foram realizados sob as mesmas condições experimentais descritas previamente.

3.7 ENSAIO DE CO-LOCALIZAÇÃO

HUVECs ($3 \times 10^4/\text{poço}$) diluídas em DMEM suplementado com 10% de FBS foram plaqueadas em sistema de lâmina com oito câmaras (*Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide System*; Thermo Scientific) revestido com COL1 (1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; BD Biosciences). No dia seguinte, as células foram incubadas por 15 minutos com 1000 nM de ALT-C marcada com o fluoróforo Alexa Fluor®-546 (A2002; Invitrogen) diluído em DMF livre de íons, seguindo instruções do fabricante (Invitrogen). Posteriormente, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 10 minutos e permeabilizadas por 1 hora com solução de bloqueio contendo 1% de BSA, 10% de soro de cabra e 0,3 M de glicina em 0,1% de Tween-PBS. Em seguida, as HUVECs foram incubadas *overnight* com anticorpo primário anti- $\alpha_2\beta_1$ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ab24697, Abcam, Cambridge, Reino Unido). No dia seguinte, as células foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti-camundongo produzido em cabra conjugado com Alexa Fluor®-488 (1:1000 *goat polyclonal anti-mouse Alexa Fluor®-488*, ab150113, Abcam). Após incubação, as câmaras foram lavadas com PBS e os núcleos celulares foram marcados com DAPI (Thermo Scientific) por 10 minutos. A montagem das lâminas foi realizada utilizando-se o reagente *ProLong™ Antifade* (Thermo Scientific). Todos os grupos foram observados em microscópio confocal *Axio Observer LSM 780* (Zeiss, Jena, Thuringia, Alemanha) sob a mesma intensidade de laser para os diferentes filtros utilizando-se o *software ZEN BLACK* num aumento de 63x. O coeficiente de co-localização de Manders' foi determinado por meio do *plugin "Colocalization Threshold"* do *software ImageJ Fiji* (versão 1.52g).

3.8 ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA PARA AVALIAÇÃO DA ADESÃO DE HUVECS À DIFERENTES PROTEÍNAS DE MATRIZ NA PRESENÇA DE ALT-C

ALT-C purificada foi incubada com o fluoróforo Alexa Fluor®-546 (A2002; Invitrogen) diluído em DMF livre de íons, seguindo instruções do fabricante (Invitrogen). HUVECs ($5 \times 10^3/\text{poço}$) foram plaqueadas em placas pretas (fundo

transparente) de 96 poços (Greiner Bio-one®) sem revestimento ou recobertas com uma fina camada de COL1 (1,5 µg/cm²; BD Biosciences) ou fibronectina (2,0 µg/cm²; Sigma-Aldrich) em DMEM contendo 10% de FBS e incubadas *overnight* a 37 °C, 5% CO₂. No dia seguinte, as células foram tratadas por 15 minutos com 1000 nM de ALT-C marcada com Alexa Fluor®-546, fixadas por 10 minutos com 4% de paraformaldeído, seguido de permeabilização por 5 minutos com 0,3% de Triton X-100 e bloqueio de 30 minutos com 2% de BSA. Núcleos celulares foram marcados com o fluoróforo DAPI (Thermo Scientific) por 10 minutos. Fotos foram obtidas por meio do microscópio *ImageXpress XLS System* (Molecular Devices) em aumento de 60x.

3.9 INIBIÇÃO DA ADESÃO CELULAR

O ensaio de inibição da adesão de células endoteliais ao COL1 foi realizado em placas pretas (fundo transparente) de 96 poços (3603; Corning®, Corning, NY, EUA) revestidas com uma camada de COL1 (1,5 µg/cm²; BD Biosciences) diluído em PBS, tendo 2% de BSA como controle negativo. O bloqueio foi feito com 1% de BSA para evitar ligações não específicas e logo após os poços da placa foram lavados com DMEM não suplementado. Ao mesmo tempo, HUVECs (1 x 10⁵/poço) foram incubadas durante 45 minutos com 1000 nM de ALT-C e/ou VEGF (10 ng/mL; Peprotech) em DMEM não suplementado. Em seguida, as células foram plaqueadas nos poços que passaram pelo tratamento descrito previamente e a adesão ocorreu durante 1 hora a 37 °C, 5% CO₂. Passado este tempo, os poços foram lavados 3x com DMEM não suplementado e as células foram fixadas por 10 minutos com 4% de paraformaldeído. Os núcleos foram marcados por 10 minutos com DAPI (Thermo Scientific) e contados automaticamente por meio do microscópio *ImageXpress XLS System* (Molecular Devices) em aumento de 10x.

3.10 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

HUVECs (1 x 10³/poço) plaqueadas em placas pretas (fundo transparente) de 96 poços (3603; Corning®) e incubadas *overnight* a 37 °C, 5% CO₂, passaram por um período de 24 horas em DMEM não suplementado (*starvation period*), seguido de tratamento com ALT-C (1000 nM), VEGF (10 ng/mL; Peprotech)

ou ambos diluídos em DMEM suplementado com 0,5% de FBS mais solução de resazurina seguindo protocolo fornecido pelo fabricante (*Alamar Blue*; Invitrogen). A fluorescência foi medida após 6, 24 e 48 horas de tratamento no espectrofotômetro *SpectraMax I3x* (555 nm de excitação e 590 nm de emissão; Molecular Devices) utilizando-se o protocolo de leitura 'Cell Viability Assay – Resazurin, Alamar Blue – Cell Titer' do software *Softmax Pro* (versão 6.4).

3.11 ENSAIO DE MIGRAÇÃO TRANSWELL

A migração celular foi realizada em insertos contendo membranas translúcidas com poros de 8 μm (ThinCert™ translucent PET membrane RoTrac®; Greiner Bio-one®) como descrito previamente (DANILUCCI et al., 2019). HUVECs (1×10^5 /poço) foram tratadas com ALT-C (1000 nM), VEGF (10 ng/mL; Peprotech) ou VEGF mais ALT-C (1000 nM) e imediatamente inseridas nas câmaras de *Boyden*. As câmaras foram imersas em DMEM suplementado com 10% de FBS e a migração ocorreu durante 6 e 24 horas a 37 °C. Para o controle negativo as câmaras foram inseridas em DMEM não suplementado. As células que migraram foram fixadas nas membranas com 4% de paraformaldeído e seus núcleos foram marcados com DAPI (Thermo Scientific). As membranas foram montadas em lâminas histológicas e as células foram contadas utilizando-se o microscópio *ImageXpress XLS System* (Molecular Devices) em aumento de 10x.

3.12 ENSAIO DE ANGIOGÊNESE SOBRE MATRIGEL (TUBULOGÊNESE)

Este ensaio foi realizado como um modelo de angiogênese *in vitro*, considerando-se os efeitos da ALT-C na formação de túbulos das células endoteliais. O protocolo foi padronizado pelo nosso grupo de pesquisa (LBBM) tendo como base dados na literatura (ARNAOUTOVA; KLEINMAN, 2010; DECICCO-SKINNER et al., 2014). Brevemente, 35 μL de matrigel gelado e com fator de crescimento reduzido (*Matrigel® Growth Factor Reduced-GRF Basement Membrane Matrix, *LDEV-Free*; Corning®) foram diluídos em DMEM suplementado com 0,5% de FBS, adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) e incubados a 37 °C, 5% CO₂ por 1 hora até completa polimerização. HUVECs (3×10^4 /poço) foram tratadas com VEGF (10 ng/mL;

PeproTech), ALT-C (200, 500 e 1000 nM) ou ambos em DMEM contendo 0,5% de FBS por 30 minutos em temperatura ambiente e depois plaqueadas sobre o matrigel solidificado. Tratamento com anticorpo anti- $\alpha_2\beta_1$ [P1E6] (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ab24697; Abcam) foi utilizado como controle negativo. A placa foi incubada a 37 °C, 5% CO_2 por 14 horas, permitindo assim a formação de túbulos. Estruturas semelhantes a capilares foram observadas por meio de microscópio invertido (Vert.A1; Zeiss) e fotografadas utilizando-se do *software AxionVision Rel.4.8* num aumento de 10x. Todas as análises foram realizadas através do *plugin Angiogenesis Analyzer* (CARPENTIER et al., 2012) no *software ImageJ Fiji* (versão 1.52g).

3.13 RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE

A afinidade da ALT-C ao VEGFR2 imobilizado foi medida por meio de ressonância plasmônica (BIAcore T200; GE Healthcare). A superfície do chip CM5 (GE Healthcare) foi ativada com uma mistura (1:1) de 400 mM de cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e 100 nM de N-hidroxissuccinimida (NHS). Em seguida, VEGFR2 (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diluído em 10 mM de acetato de sódio (pH 4) foi injetado no chip em um fluxo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ (25 °C), resultando em ~12900 unidades de ressonância (UR). Grupos ativos na superfície do chip foram bloqueados com 1 M de etanolamina (pH 8.5). ALT-C diluída em PBS foi injetada sobre a superfície do chip num fluxo de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. Um tempo de contato de 420 segundos (25 °C) foi padronizado para o VEGFR2, seguido de um tempo de dissociação de 900 segundos utilizando-se PBS. A regeneração do CM5 foi feita com 2 M de glicina-HCl (pH 2) em um tempo de contato de 10 segundos. As análises foram realizadas por meio do *software Biacore T200* (versão 3). O sinal da superfície de referência foi subtraído dos sensogramas e os parâmetros cinéticos foram calculados por meio de regressão linear utilizando o programa *GraphPad Prism* (versão 5).

3.14 DETECÇÃO DE VEGFR2 E LC3B POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

HUVECs (1 x 10⁴/poço) diluídas em DMEM suplementado com 10% de FBS foram plaqueadas em placas pretas (fundo transparente) de 96 poços (Greiner Bio-one®) revestidas com uma fina camada de COL1 (1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; BD Biosciences)

e incubadas *overnight* a 37 °C, 5% CO₂. No dia seguinte, as células foram tratadas com ALT-C (1000 nM), VEGF (10 ng/mL; Peprotech) ou ambos por 30 minutos em DMEM com 0,5% de FBS. Posteriormente, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 10 minutos, bloqueadas com 1% de BSA por 1 hora e incubadas por 2 horas com anticorpos primários anti-VEGFR2 (3 µg/mL; ab39256; Abcam) ou anti-LC3B (1:2000; ab51520; Abcam) diluídos em 1% de BSA-PBS. Após este período, as HUVECs foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra conjugado com alofocianina (*goat anti-rabbit IgG, allophycocyanin - APC*; 1:1000; ab130805; Abcam) diluído em 1% de BSA-PBS. Os núcleos celulares foram marcados por 10 minutos com DAPI (Thermo Scientific). Imagens foram obtidas por meio do microscópio *ImageXpress XLS System* (Molecular Devices) em aumento de 60x. A intensidade de fluorescência de todos os grupos analisados foi calculada como 'intensidade média de fluorescência das vesículas por intensidade média de fluorescência dos núcleos' utilizando-se do módulo *Transfluor* do *software MetaXpress* (Molecular Devices).

3.15 WESTERN BLOTTING

Este ensaio foi realizado seguindo-se protocolo descrito na literatura (DANILUCCI et al., 2019) com algumas modificações. HUVECs (3 x 10⁵/poço) foram plaqueadas em placas de Petri de 3 cm e incubadas *overnight* a 37 °C, 5% CO₂, seguido de um período de 24 horas de incubação em DMEM sem suplementação (*starvation period*). Posteriormente, as células foram tratadas com VEGF (10 ng/mL; Peprotech), ALT-C (1000 nM) ou ambos e incubadas por períodos de 1 e 24 horas a 37 °C, 5% CO₂. A lise celular ocorreu utilizando-se 100 µL de tampão de lise (50 mM de Tris-HCl pH 7.4, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de ortovanadato de sódio, 1 mM de fluoreto de sódio, 1% de Tween-20, 0,25% de deoxicolato de sódio, 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsufonil, 1 µg/mL de aprotinina e 1 µg/mL de leupeptina) e os lisados obtidos foram centrifugados a 14000 rpm por 20 minutos (4 °C). A quantificação proteica do sobrenadante foi determinada utilizando-se ensaio colorimétrico de BCA seguindo instruções do fabricante (Thermo Scientific). As proteínas celulares foram misturadas ao tampão de *Laemmli* e fervidas a 100 °C por 5 minutos. Alíquotas contendo 20 µg de proteína de cada grupo foram separadas em géis de 10% (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 µm;

Bio-Rad), as quais foram bloqueadas com tampão Tween-TBS (140 mM de NaCl, 2,6 mM de KCl, 25 mM de Tris pH 7.4 e 0,05% de Tween-20) em 5% de leite desnatado.

O ensaio de *Western Blotting* foi realizado utilizando-se os seguintes anticorpos primários: anti- α_2 (1:10000, ab133557, Abcam), anti- β_1 (1:200, sc-13590, Santa Cruz Biotechnology), anti- β_1 fosforilada [T788+T789] (0,5 $\mu\text{g/mL}$, ab5189, Abcam), anti-VEGFR2 (0,5 $\mu\text{g/mL}$, ab39256, Abcam), anti-VEGFR2 fosforilado [Y1054+Y1059] (0,5 $\mu\text{g/mL}$, ab5473, Abcam), anti-FAK (1:1000, ab40794, Abcam), anti-FAK fosforilada [Y397] (1:1000, a81298, Abcam), anti-Src fosforilado [Tyr418] (1:1000, S1940-1VL, Sigma Aldrich), anti-paxilina fosforilada (1:500, P6368-100UL, Sigma Aldrich), anti-ERK1+ERK2 (1:500, ab17942, Abcam), anti-ERK1+ERK2 fosforilada [Y204+Y187] (1:500, ab47339, Abcam), anti-PI3K (1:1000, a86714, Abcam), anti-PI3K fosforilada [Y607] (1:1000, ab182651, Abcam), anti-LC3B (1:3000, ab51520, Abcam) e anti-Beclin-1 (D40C5) (1:1000, 3495, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA). GAPDH (1:15000, ab181602, Abcam) foi utilizado como controle de carregamento. As membranas de nitrocelulose foram reveladas por meio de reagente quimioluminescente (*Clarity™ Western ECL Substrate*; Bio-Rad). As bandas foram visualizadas no equipamento ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad) e quantificadas por análise densitométrica utilizando-se o *software* ImageJ (versão 1.51n). HUVECs (3×10^5 células/poço) também foram tratadas por 1 hora com anticorpo bloqueador da integrina $\alpha_2\beta_1$ [P1E6] (3 $\mu\text{g/mL}$; ab24697, Abcam) e *Western Blotting* adicional foi realizado nas mesmas condições experimentais descritas anteriormente, utilizando-se o anticorpo anti-FAK fosforilada [Y397] (1:1000, a81298, Abcam).

3.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

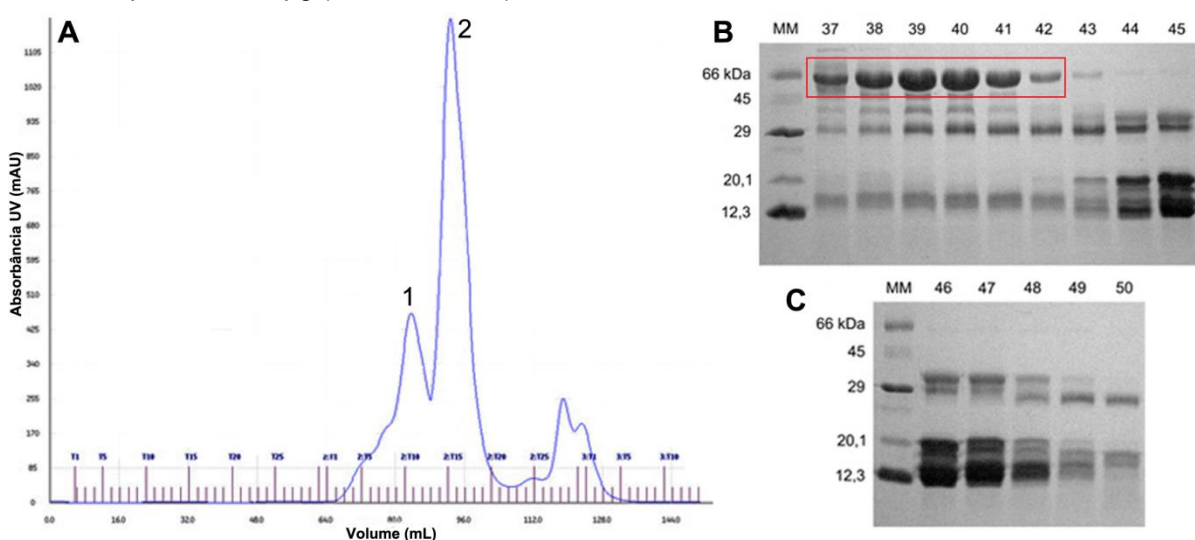
Todos os ensaios realizados no presente trabalho foram analisados estatisticamente. Dados foram obtidos de pelo menos três experimentos independentes em triplicata e as análises realizadas através do programa estatístico *GraphPad Prism* (versão 5). A média e o erro padrão da média foram calculados e comparações entre os grupos foram feitas através de análise de variância ANOVA utilizando-se os testes *One* ou *Two-Way* com post-hoc de Bonferroni ou Dunnett. Valores de $p < 0,05$ foram considerados com significância estatística.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PURIFICAÇÃO DA DESINTEGRINA-SÍMILE ALT-C

Na primeira etapa cromatográfica, 50 mg da peçonha bruta liofilizada da serpente *Bothrops alternatus* foram submetidos à cromatografia em gel filtração utilizando a coluna Hiload® 16/600 Superdex® 200 pg (GE Healthcare) de acordo com metodologia proposta por Souza e colaboradores (SOUZA et al., 2000). As frações referentes aos dois primeiros picos do cromatograma obtido (picos 1 e 2; Figura 13A) foram separadas e visualizadas por meio de géis de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) (Figura 13B-C). Frações apresentando bandas em aproximadamente 66 kDa (frações 37-42; Figura 13B), equivalentes à metaloproteinase alternagina descrita anteriormente por Souza e colaboradores (SOUZA et al., 2000), foram selecionadas e passaram por auto processamento proteolítico durante 27 horas em temperatura ambiente.

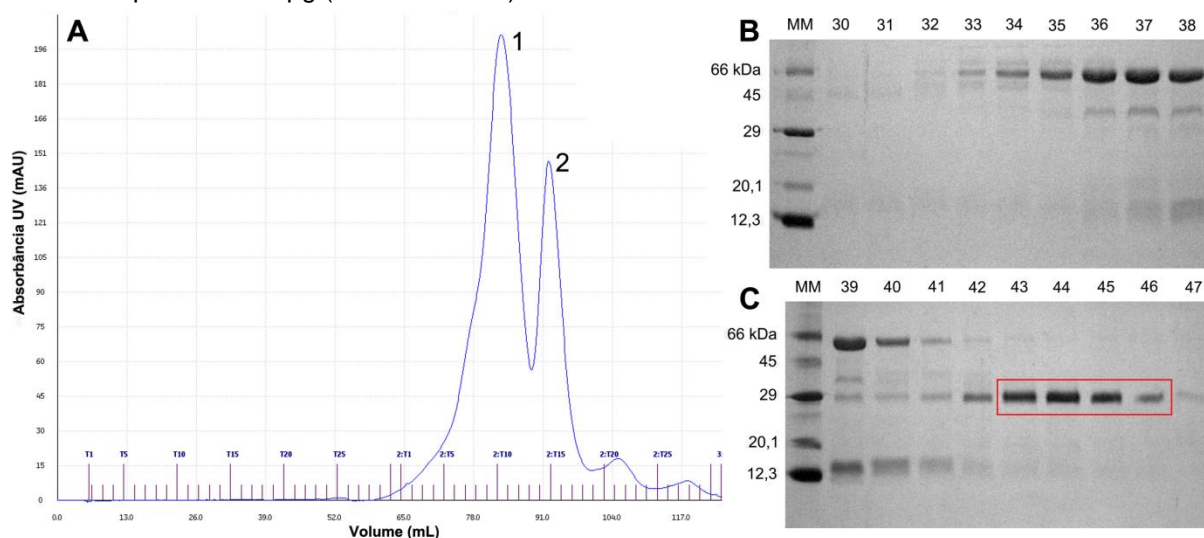
Figura 13 - Primeira etapa cromatográfica (gel filtração) da purificação da ALT-C em coluna Hiload® 16/600 Superdex® 200 pg (GE Healthcare)



A, Cromatograma obtido. Os picos analisados foram numerados (pico 1 = frações 37-42; pico 2 = frações 43-50). Eixo y = absorvância em mAU; eixo x = volume em mL **B,C**, Géis de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE, sob condições redutoras) para visualização das frações obtidas após cromatografia. Volume de amostra = 20 µL/poço. Cada fração corresponde a um volume eluído igual a 2,0 mL. MM = marcador de massa molecular (66 kDa – BSA; 45 kDa – ovalbumina; 29 kDa – anidrase carbônica; 20,1 kDa – inibidor de tripsina de soja; 12,3 kDa – citocromo C). Retângulo vermelho = bandas de interesse contendo a alternagina em 66 kDa, proteína descrita previamente na literatura (SOUZA et al., 2000)

Após o auto processamento proteolítico da alternagina, presente nas frações 37 a 42, esta foi concentrada para 1,0 mL utilizando-se o concentrador Centriprep® (membrana de 10K, 4305; Merk Millipore, Darmstadt, Hesse, Alemanha) numa rotação de 3000 rcf (força centrífuga relativa) a 4 °C. A segunda etapa cromatográfica em gel filtração seguiu os mesmos parâmetros da primeira etapa. As frações referentes aos dois primeiros picos do cromatograma obtido (picos 1 e 2; Figura 14A) foram separadas e visualizadas por meio de géis de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) (Figura 14B-C). Frações apresentando bandas em aproximadamente 29 kDa (frações 43 a 46; Figura 14C), as quais correspondem à proteína ALT-C descrita anteriormente por Souza e colaboradores (SOUZA et al., 2000), foram selecionadas, concentradas para 1,0 mL e submetidas à terceira etapa cromatográfica (troca aniônica).

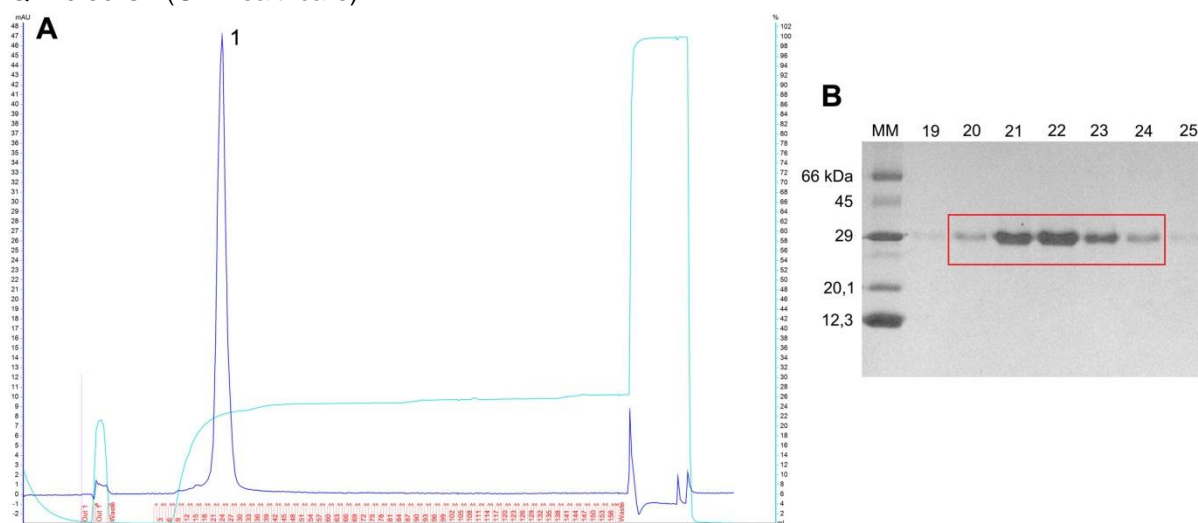
Figura 14 - Segunda etapa cromatográfica (gel filtração) da purificação da ALT-C em coluna Hiload® 16/600 Superdex® 200 pg (GE Healthcare)



A, Cromatograma obtido. Os picos analisados foram numerados (pico 1 = frações 30-42; pico 2 = frações 43-47). Eixo y = absorbância em mAU; eixo x = volume em mL **B,C**, Géis de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE, sob condições redutoras) para visualização das frações obtidas após cromatografia. Volume de amostra = 20 µL/poço. Cada fração corresponde a um volume eluído igual a 2,0 mL. MM = marcador de massa molecular (66 kDa – BSA; 45 kDa – ovalbumina; 29 kDa – anidrase carbônica; 20,1 kDa – inibidor de tripsina de soja; 12,3 kDa – citocromo C). Retângulo vermelho = bandas de interesse contendo a ALT-C em 29 kDa, proteína descrita previamente na literatura (SOUZA et al., 2000)

A amostra advinda da segunda cromatografia em gel filtração foi submetida à cromatografia de troca aniônica utilizando-se coluna Mono Q™ 5/50 GL (GE Healthcare). As frações referentes ao pico 1 (Figura 15A) foram separadas e visualizadas por meio de gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) (Figura 15B).

Figura 15 - Terceira etapa cromatográfica (troca aniônica) da purificação da ALT-C em coluna Mono Q™ 5/50 GL (GE Healthcare)



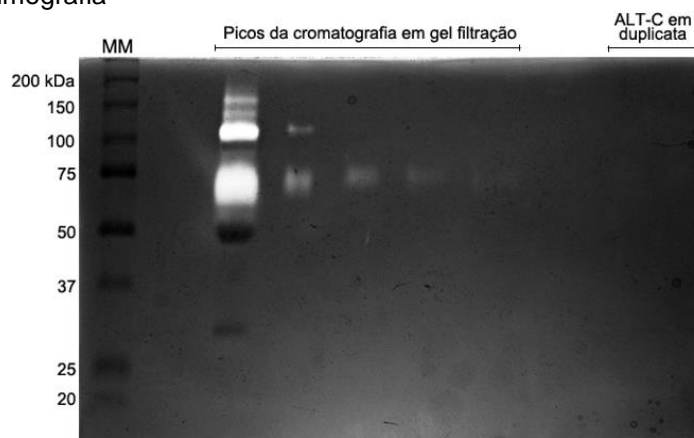
A, Cromatograma obtido. Pico analisado indicado pelo número 1 (frações 19-25). Eixo y = absorbância em mAU; eixo x = volume em mL **B**, Gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE, sob condições redutoras) para visualização das frações obtidas após cromatografia. Volume de amostra = 20 µL/poço. Cada fração corresponde a um volume eluído igual a 500 µL. MM = marcador de massa molecular (66 kDa – BSA; 45 kDa – ovalbumina; 29 kDa – anidrase carbônica; 20,1 kDa – inibidor de tripsina de soja; 12,3 kDa – citocromo C). Retângulo vermelho = bandas de interesse contendo a ALT-C em 29 kDa (sem contaminantes)

Ao todo foram realizadas quatro purificações, das quais obtivemos um rendimento proteico igual a 4,38 mg de ALT-C/200 mg de peçonha bruta.

4.2 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DA ALT-C PURIFICADA

Primeiramente, 20 µg de ALT-C (em duplicata) foram resolvidos em um gel de poliacrilamida 10% contendo 0,1% de gelatina (sob condições não redutoras) em ensaio de zimografia. Verificamos que a desintegrina-símile ALT-C não está contaminada por proteases contidas na peçonha de *B. alternatus*, as quais se mostraram presentes apenas nas alíquotas dos picos da cromatografia em gel filtração utilizadas como controle positivo do experimento. Nestas alíquotas observa-se a degradação da gelatina copolimerizada ao gel (Figura 16). Este resultado é indicativo da eficiência de nossa metodologia de purificação proteica.

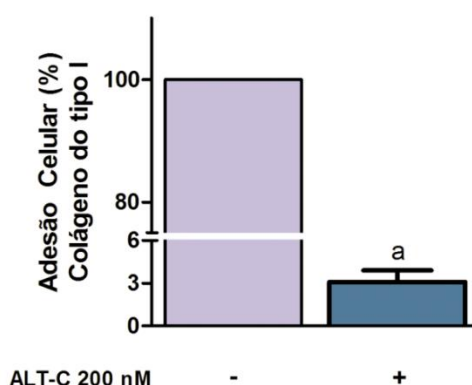
Figura 16 - Gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE), copolimerizado com 0,1% de gelatina, obtido pelo ensaio de zimografia



Alíquotas de ALT-C (29 kDa; duplicata de 20 µg sob condições não redutoras) foram aplicadas nos dois últimos poços do gel para verificação da eficiência de sua purificação. Nota-se a ausência de degradação da gelatina, evidenciando o caráter não enzimático da desintegrina-símile e confirmação de sua pureza. Alíquotas dos picos da cromatografia em gel filtração contendo proteases foram utilizadas como controle positivo do experimento (poços 3 a 7). Nota-se a presença de degradação da gelatina, indicativo de atividade proteolítica. MM = marcador de massa molecular pré corado, que engloba uma mistura de dez proteínas recombinantes variando de 10 a 250 kDa (*Precision Plus Protein Standards Dual Color*, 161-0394; Bio-Rad)

A atividade biológica da ALT-C foi verificada por meio de ensaio de inibição da adesão da linhagem K-562- $\alpha_2\beta_1$ ao COL1 como descrito anteriormente (SOUZA et al., 2000). Células eritroleucêmicas K562 contêm 97% de integrina β_1 em sua superfície, aderindo naturalmente à fibronectina da MEC. Por apresentar apenas 2% de integrina α_2 , essa linhagem celular não consegue se aderir ao COL1 (JÄRVINEN; YLÄNNE; VIRTANEN, 1993). Entretanto, ao serem transfectadas com a integrina $\alpha_2\beta_1$, as K562 adquirem a capacidade de se aderirem ao COL1, sendo assim utilizadas como modelo de estudo em ensaios cujo foco é testar o potencial de inibição da adesão ao COL1 promovido por proteínas ou moléculas de interesse. No presente trabalho, comprovamos que a ALT-C (200 nM; $IC_{50} = 100$ nM) é capaz de inibir em 97% a adesão das células K-562- $\alpha_2\beta_1$ ao COL1 (Figura 17), sendo considerada apta para os demais ensaios biológicos, os quais utilizaram as células endoteliais de cordão umbilical humano – HUVEC.

Figura 17 - ALT-C se mostrou biologicamente ativa ao inibir a adesão de células K-562- $\alpha_2\beta_1$ ao COL1



Teste biológico da ALT-C por ensaio de inibição da adesão. K-562- $\alpha_2\beta_1$ foram tratadas com ALT-C (200 nM; IC_{50} = 100 nM) por 45 minutos e plaqueadas sobre poços recobertos com COL1. A adesão ocorreu durante 1 hora em incubador a 37 °C, 5% de CO_2 . Valores de $p < 0,05$ foram considerados com significância estatística quando comparados ao grupo controle (a). Todos os dados foram representados como média \pm erro padrão da média. O ensaio foi repetido pelo menos três vezes em triplicata

4.3 MARCAÇÃO DA ALT-C COM O FLUORÓFORO ALEXA FLUOR[®]-546

Uma alíquota da ALT-C purificada foi marcada com o fluoróforo Alexa Fluor[®]-546 seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen), as quais estão descritas na sessão Materiais e Métodos (item 3.3). A remoção do excesso do fluoróforo foi realizada mediante purificação cromatográfica da qual obtivemos três frações contendo concentrações e molaridades similares de ALT-C-AlexaFluor[®]-546 (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentrações e molaridades de três frações de ALT-C marcadas com Alexa Fluor[®]-546

	Concentração (mg/mL)	Molaridade (nM)
Fração 1	1,115	38600
Fração 2	1,1	37900
Fração 3	1,07	36800

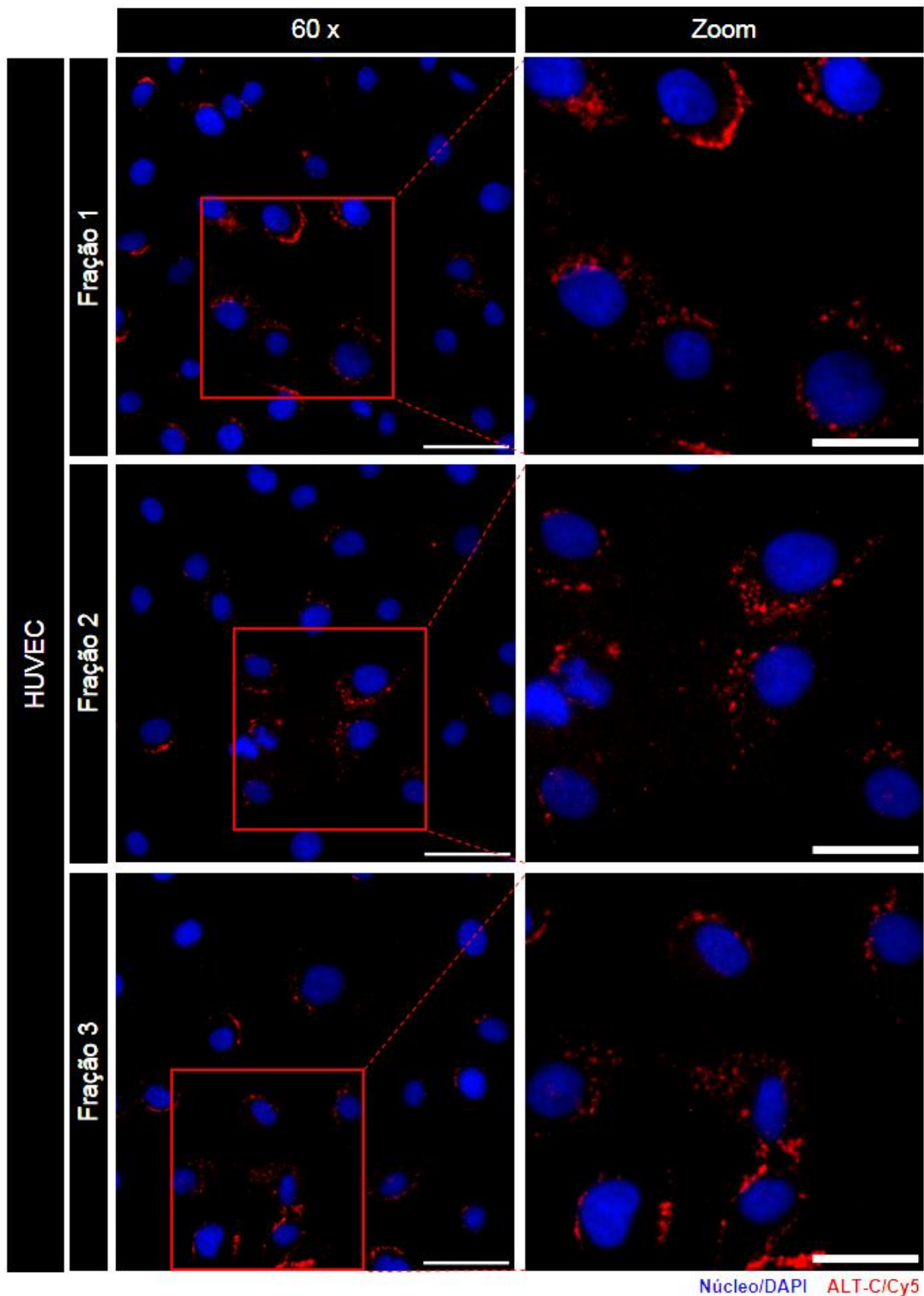
As frações foram obtidas após purificação cromatográfica (coluna de gel filtração) para remoção do excesso do fluoróforo Alexa Fluor[®]-546. As concentrações proteicas foram determinadas no espectrofotômetro *SpectraMax 13x* (absorbância 280 nM) com posterior cálculo para correção da contribuição do fluoróforo na absorbância da proteína

Verificamos, por ensaio de fluorescência, que a marcação da ALT-C com o fluoróforo Alexa Fluor[®]-546 foi eficiente (ALT-C em vermelho, núcleos em azul; Figura 18). As 3 frações cromatográficas foram capazes de se ligar às HUVECs. A

fração 1 foi selecionada para utilização nos ensaios de Adesão de HUVECs à diferentes proteínas da MEC (COL1 e fibronectina) e de Co-localização.

Cabe ressaltar que este é o primeiro trabalho demonstrando a ligação da desintegrina-símile ALT-C marcada com o fluoróforo Alexa Fluor[®]-546 à células endoteliais (linhagem HUVEC). Experimentos anteriores mostraram que a ALT-C marcada (1000 nM; tratamento de 15 minutos) também se liga a receptores localizados em células HeLa (carcinoma de ovário humano) e células L929 (fibroblastos de camundongo) (dados não publicados pelo grupo de pesquisa LBBM), corroborando com nossos resultados.

Figura 18 - Confirmação da marcação da ALT-C com o fluoróforo Alexa Fluor®-546 através de ensaio de fluorescência

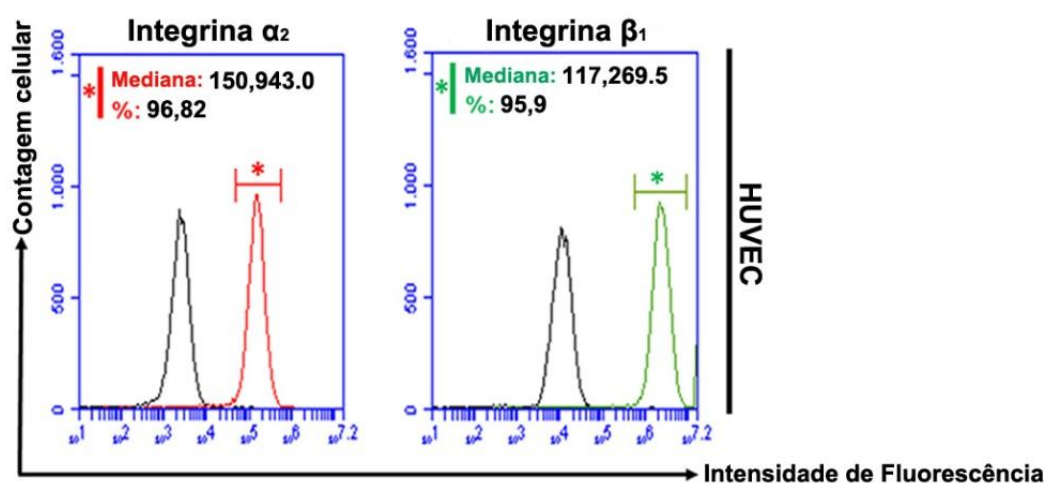


Imagens representativas da detecção da desintegrina-símile ALT-C marcada com o fluoróforo Alexa Fluor®-546 em três frações obtidas após purificação cromatográfica em coluna de gel filtração (aumento: 60x; barras de escala: 50 e 30 μ m). HUVECs foram plaqueadas em placas de 96 poços revestidas com COL1 e posteriormente tratadas com ALT-C-AlexaFluor®-546 (1000 nM) por 15 minutos. Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul) e a ALT-C é mostrada em vermelho (Cy5)

4.4 A LINHAGEM CELULAR HUVEC EXPRESSA GRANDE QUANTIDADE DE INTEGRINAS α_2 E β_1

Considerando-se que a ALT-C é uma proteína que se liga à integrina $\alpha_2\beta_1$, nós analisamos o perfil de expressão dessa integrina na superfície de HUVECs através de citometria de fluxo. Ambas as subunidades (α_2 e β_1) foram significativamente expressas na linhagem celular em estudo (96,82% α_2 ; 95,9% β_1) (Figura 19).

Figura 19 - HUVECs expressam grande quantidade de integrinas α_2 e β_1



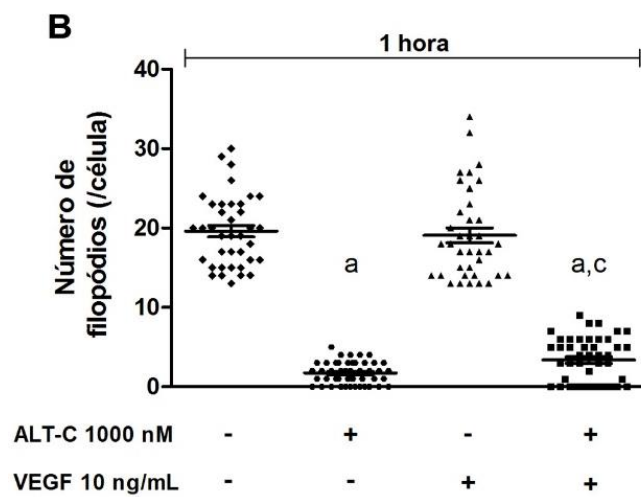
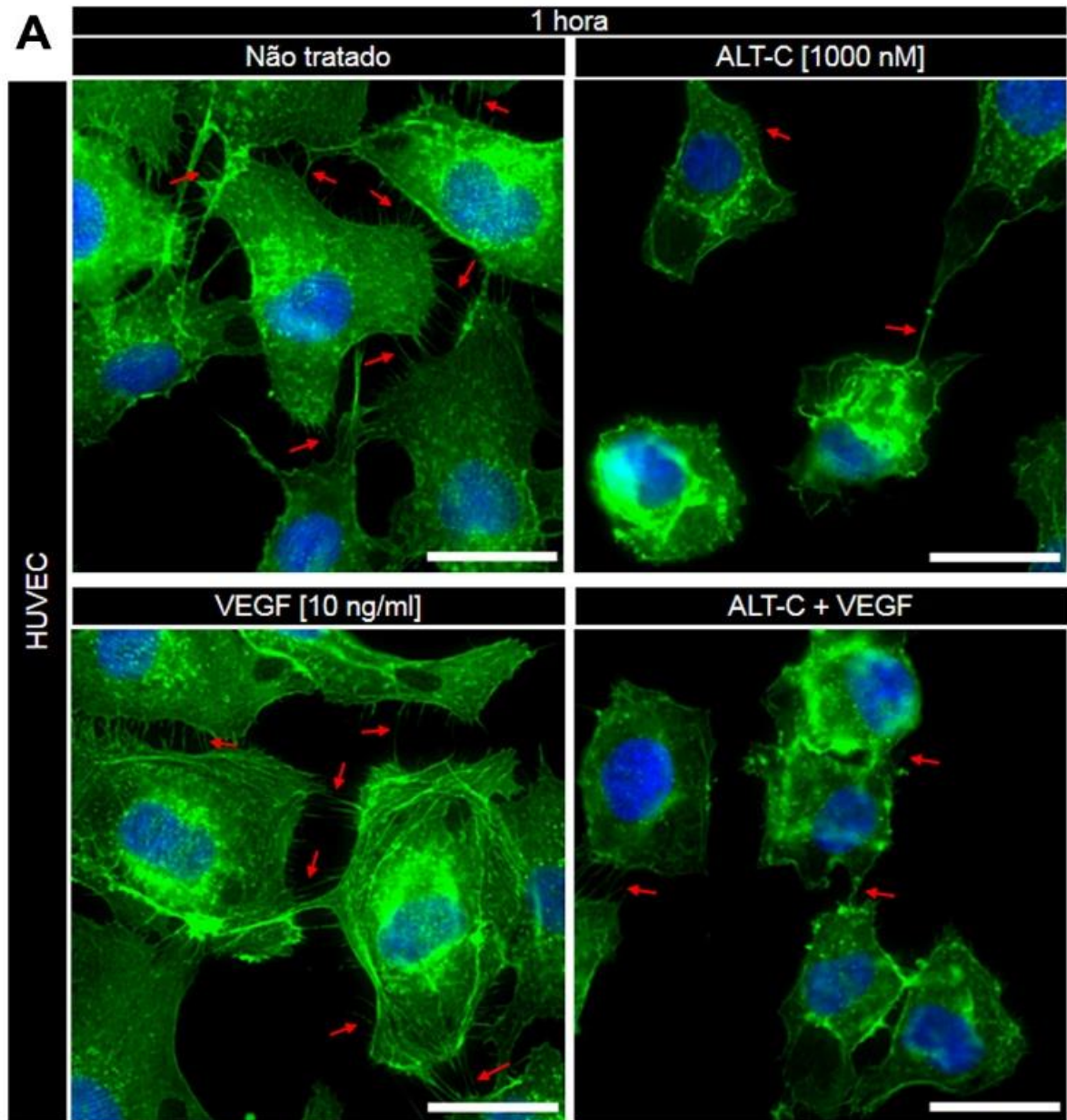
A expressão das subunidades de integrina α_2 e β_1 na superfície de HUVECs foi analisada por citometria de fluxo e determinada utilizando-se os fluorocromos ficoeritrina (PE) e isotiocianato de fluoresceína (FITC), além de anticorpos específicos. As curvas em vermelho, verde e preto representam α_2 , β_1 e o controle (isotipo). O gráfico mostra a mediana e a porcentagem de expressão das subunidades de integrina α_2 e β_1 . Os dados foram analisados através do *software FlowJo* (versão 10) do citômetro *Accuri™ C6* (BD Biosciences)

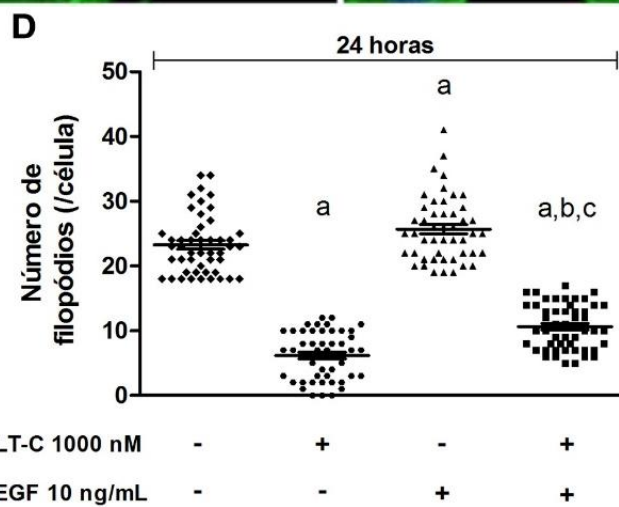
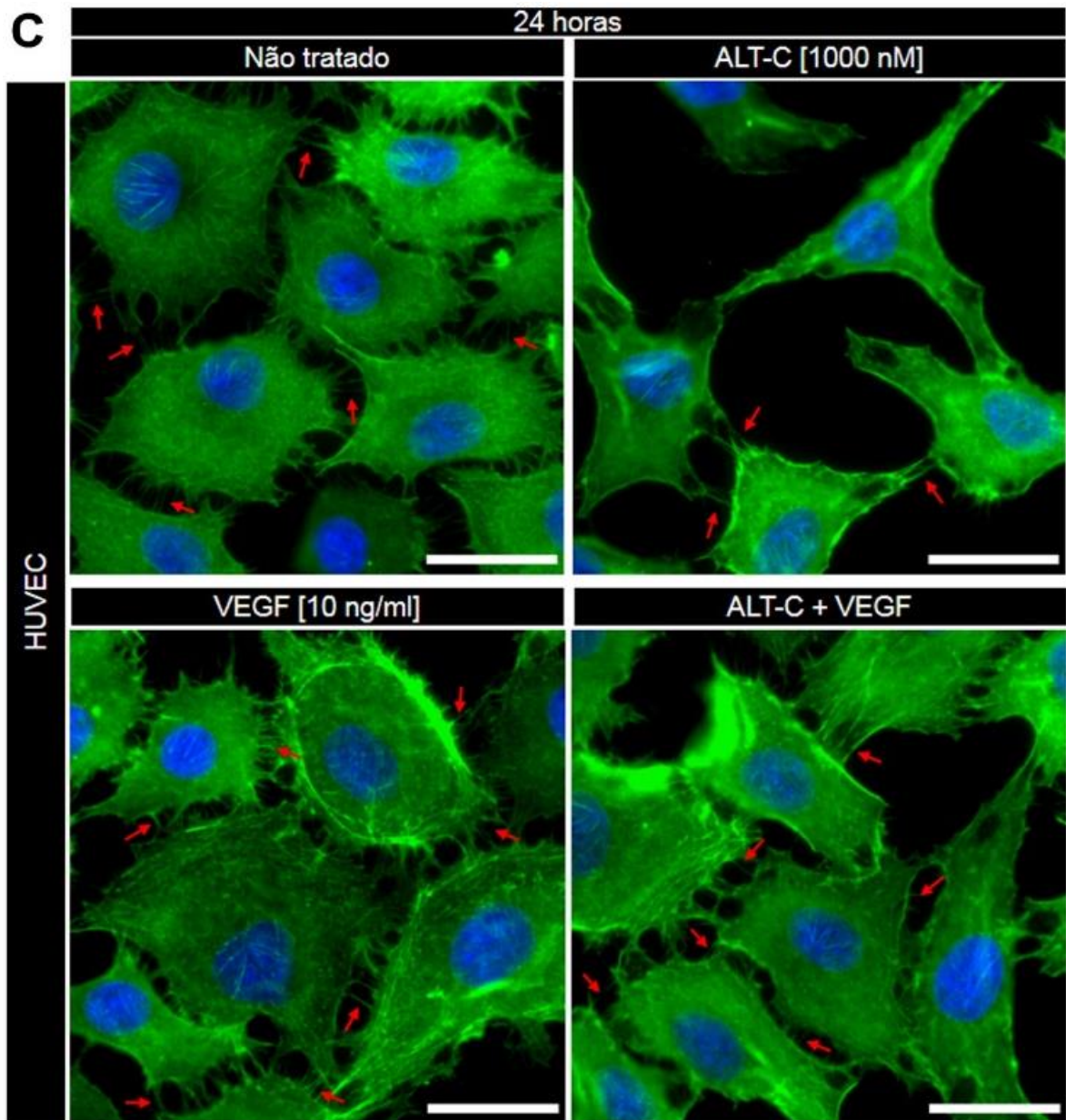
A alta expressão da integrina $\alpha_2\beta_1$ em HUVECs observada em nosso trabalho condiz com dados da literatura (SHORT; TALBOTT; JULIANO, 1998; MICOCCI et al., 2016), os quais demonstraram que essa linhagem endotelial expressa uma variada gama de integrinas em sua superfície, especialmente a integrina $\alpha_2\beta_1$, ligante de COL1, dando suporte à migração de células endoteliais e à angiogênese induzida por VEGF (SENGER et al., 2002; CHUNG et al., 2017). Em vista disso, comprovamos que as HUVECs são um ótimo modelo *in vitro* para se testar os efeitos antiangiogênicos da ALT-C consequentes do bloqueio da integrina $\alpha_2\beta_1$.

4.5 ALT-C ALTERA A MORFOLOGIA DE HUVEC E DIMINUI O NÚMERO DE FILOPÓDIOS CELULARES

Para entender melhor o mecanismo de ação da ALT-C, nós testamos a proteína em diversos ensaios celulares utilizando a linhagem endotelial HUVEC. Como nosso objetivo era entender a ação antiangiogênica da desintegrina-símile, optamos por utilizar a concentração de 1000 nM, já determinada em estudos prévios (COMINETTI et al., 2004; RAMOS et al., 2007; MORITZ et al., 2018). Primeiramente, nós observamos que o tratamento com 1000 nM de ALT-C foi capaz de provocar mudanças morfológicas nas células previamente aderidas ao COL1, com alterações no tamanho e no formato das HUVECs, além de uma drástica diminuição no número de protrusões celulares (filopódios) em ambos os tempos testados (1 e 24 horas; Figura 20). Células não tratadas e tratadas com VEGF, expostas à ALT-C durante 1 hora, adquiriram um formato circular devido à retração de seus citoesqueletos, perdendo sua morfologia típica de paralelepípedo com notável diminuição do número de filopódios (91% e 82% de diminuição, respectivamente) (Figura 20A-B). Esse efeito durou por 24 horas, já que neste tempo, as células tratadas com ALT-C (1000 nM) adquiriram um formato alongado com presença de poucos filopódios (73% de diminuição) (Figura 20C-D). Essa morfologia anormal foi parcialmente revertida na presença de VEGF, apesar da persistência do decréscimo de filopódios neste grupo (57% de diminuição) (Figura 20C-D). Esses resultados demonstraram que a ALT-C altera a morfologia das células endoteliais mesmo na presença de VEGF, e que a retração dos citoesqueletos celulares pode estar associada aos efeitos causados pela desintegrina-símile na adesão celular ao COL1, efeitos testados nos ensaios de adesão realizados no presente trabalho.

Figura 20 - ALT-C altera a morfologia de células endoteliais (HUVEC) e diminui o número de filopódios celulares



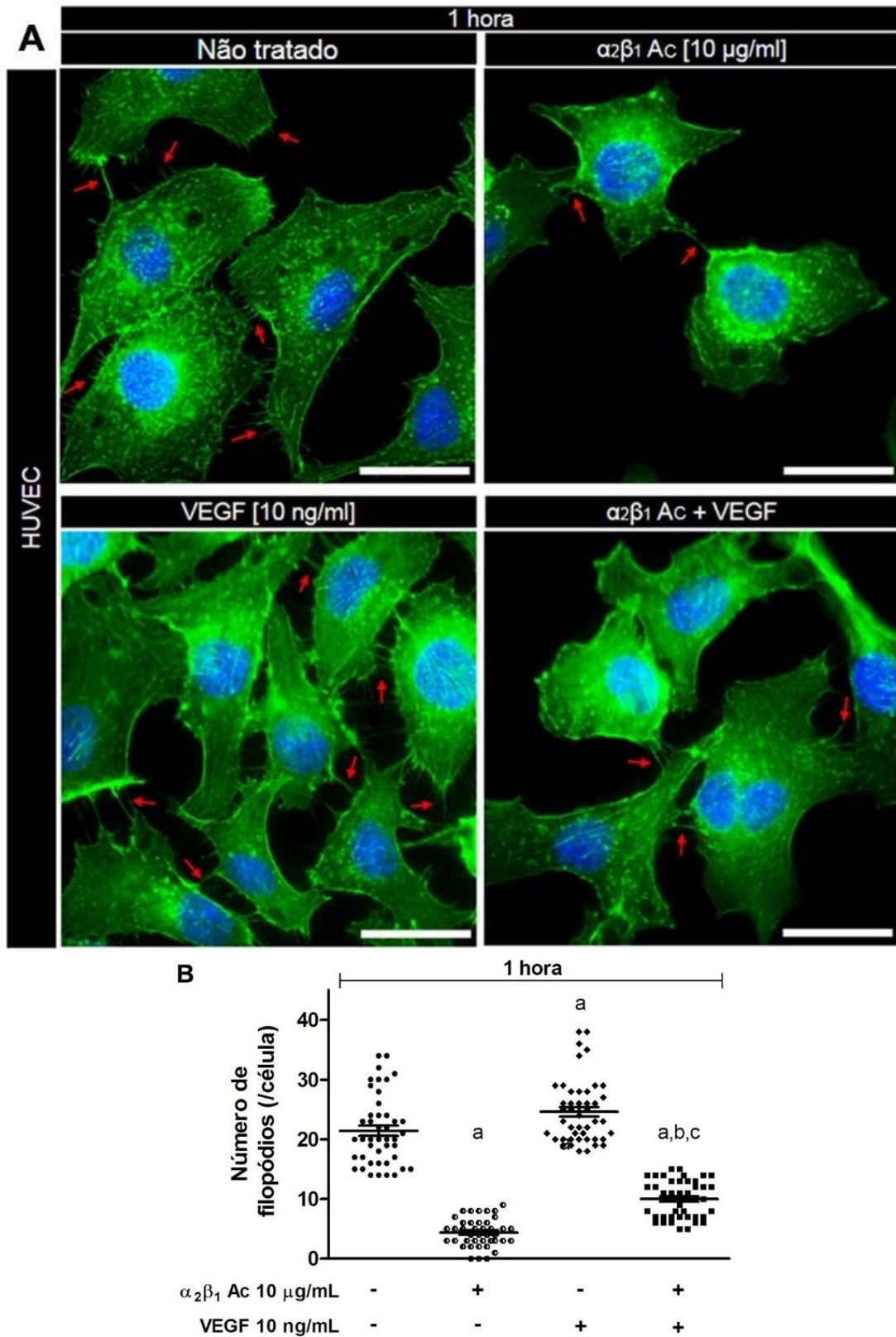


A,C, Imagens representativas mostrando a morfologia de HUVECs e seus filopódios (setas vermelhas) após incubação com ALT-C (1000 nM) nos tempos de 1 e 24 horas. Núcleos celulares e

citoesqueletos foram marcados com DAPI (azul) e Alexa Fluor®-488 faloidina (verde), respectivamente. Aumento: 60x; barra de escala: 30 μm . **B,D**, Número de filopódios após tratamento com ALT-C (1000 nM) nos tempos de 1 e 24 horas representado em gráficos de dispersão. Cinco sítios por grupo foram escolhidos aleatoriamente para contagem de filopódios usando o *software* ImageJ Fiji. Todos os dados foram obtidos de pelo menos três experimentos independentes em triplicata e representados como média \pm erro padrão da média. Valores de $p < 0,05$ foram considerados com significância estatística quando comparados aos grupos controle (a), ALT-C (b) e VEGF (c)

Resultados similares foram obtidos quando tratamos as HUVECs com anticorpo bloqueador da integrina $\alpha_2\beta_1$. Células não tratadas e tratadas com VEGF incubadas por 1 hora com anticorpo anti- $\alpha_2\beta_1$ exibiram um formato arredondado com citoesqueleto de actina retraído e diminuição no número de filopódios (79,6% e 59,4% de diminuição, respectivamente) (Figura 21A-B).

Figura 21 - Tratamento com anticorpo bloqueador da integrina $\alpha_2\beta_1$ altera a morfologia de HUVECs e diminui o número de filopódios das células

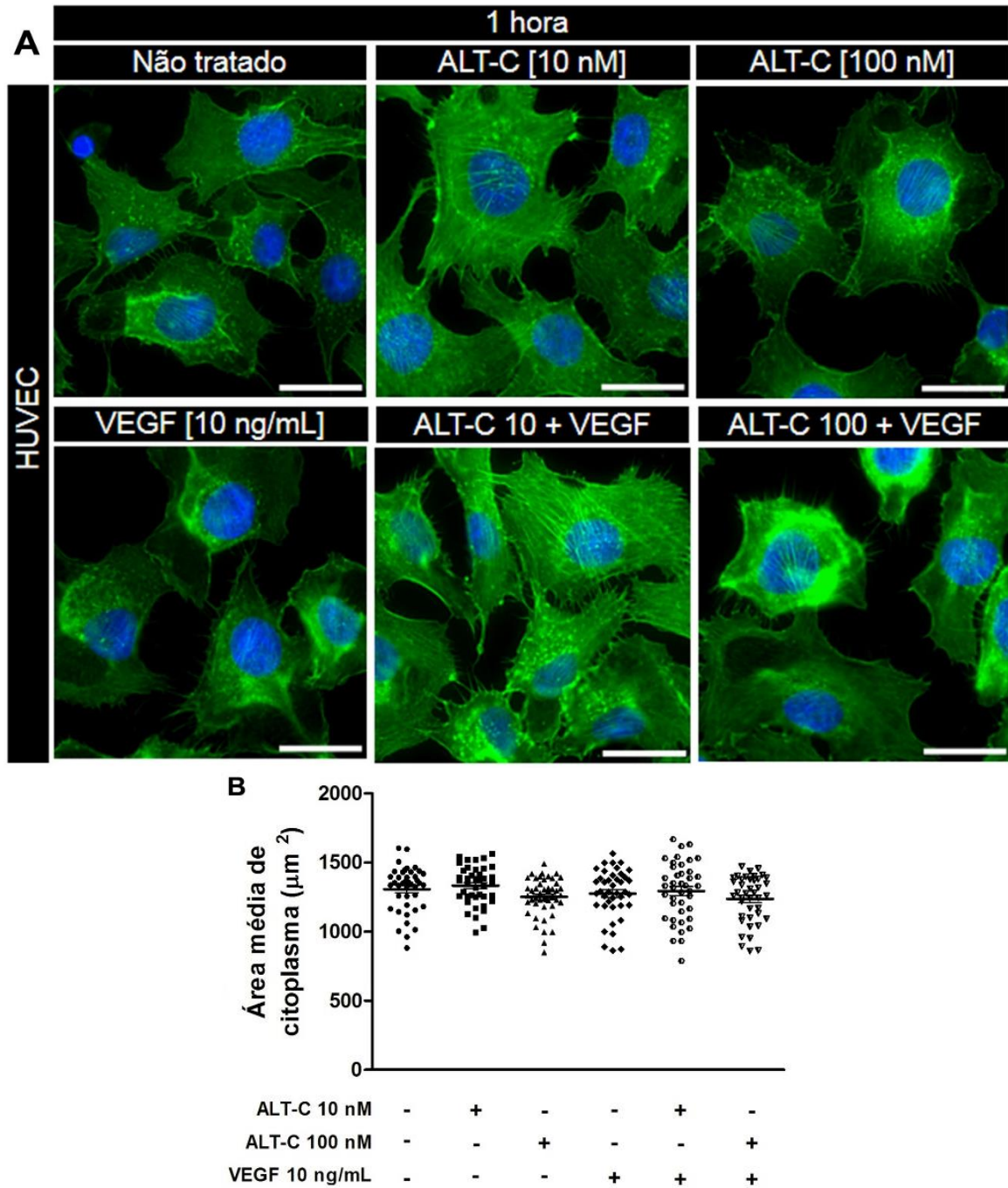


A, Imagens representativas mostrando a morfologia de HUVECs e seus filopódios (setas vermelhas) após tratamento com anticorpo bloqueador da integrina $\alpha_2\beta_1$ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 1 hora de incubação). Núcleos celulares e citoesqueletos foram marcados com DAPI (azul) e Alexa Fluor[®]-488 faloidina (verde), respectivamente. Aumento: 60x; barra de escala: 30 μm . **B**, Número de filopódios após

tratamento com anticorpo bloqueador da integrina $\alpha_2\beta_1$ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 1 hora de incubação) representado em gráfico de dispersão. Cinco sítios por grupo foram escolhidos aleatoriamente para contagem de filopódios usando o *software* ImageJ Fiji. Todos os dados foram obtidos de pelo menos três experimentos independentes em triplicata e representados como média \pm erro padrão da média. Valores de $p < 0,05$ foram considerados com significância estatística quando comparados aos grupos controle (a), Ac bloqueador $\alpha_2\beta_1$ (b) e VEGF (c)

Em contrapartida, HUVECs tratadas com 10 e 100 nM de ALT-C por 1 hora mantiveram suas morfologias normais e similares a paralelepípedos (Figura 22A). As áreas médias citoplasmáticas de 41 sítios por grupo foram calculadas, e quantitativamente não obtivemos diferença estatística em relação ao tamanho dos citoesqueletos das HUVECs após incubação com baixas concentrações da desintegrina-símile (Figura 22B).

Figura 22 - ALT-C em baixas concentrações (10 e 100 nM) não altera a morfologia de HUVECs



A, Imagens representativas de HUVECs tratadas com 10 e 100 nM de ALT-C na presença ou ausência de VEGF (10 ng/mL) (incubação de 1 hora). Núcleos celulares e citoesqueletos foram marcados com DAPI (azul) e Alexa Fluor®-488 faloidina (verde), respectivamente. Aumento: 60x; barra de escala: 30 μm . **B**, Área média de citoplasma das células (μm^2) tratadas com 10 e 100 nM de ALT-C por 1 hora representada em gráfico de dispersão. Quarenta e um sítios por grupo foram escolhidos aleatoriamente para medição de seus citoplasmas usando o módulo *Multi Wavelength Cell Scoring* do software *MetaXpress* (equipamento *ImageXpress*; Molecular Devices). Todos os dados foram obtidos de pelo menos três experimentos independentes em triplicata e representados como média \pm erro padrão da média

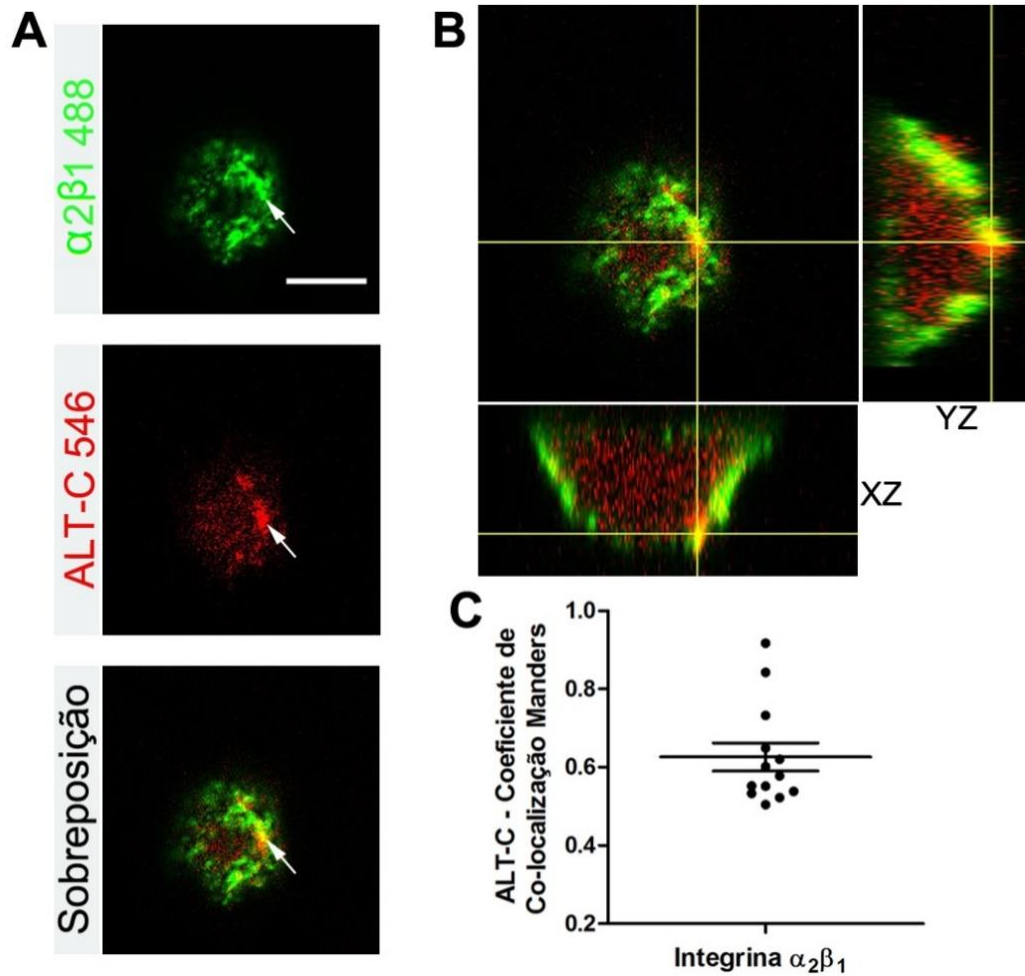
A morfologia de uma célula é determinada pelo microambiente circundante através da ativação periódica dos eventos de motilidade, mecanossensação e mecanoresposta, eventos estes gerados por hormônios e receptores tirosina quinase (ISKRATSCH; WOLFENSON; SHEETZ, 2014). Os principais parâmetros do microambiente que moldarão a morfologia de uma célula são: rigidez, arquitetura e composição da MEC, levando-se em conta que as células estabelecem suas morfologias em diferentes ambientes através de mudanças em seus citoesqueletos de actina (WOLFENSON; YANG; SHEETZ, 2018). Filamentos de actina podem se agrupar e dar origem a duas estruturas que participam ativamente dos processos de migração e de adesão celular: lamelipódios e filopódios. Os lamelipódios são uma densa rede de filamentos de actina curtos e ramificados enquanto que os filopódios são protuberâncias finas e transitórias formadas por feixes paralelos de actina (XUE; JANZEN; KNECHT, 2010; PHNG; STANCHI; GERHARDT, 2013). Durante a angiogênese, as células endoteliais estendem os filopódios, os quais funcionam como importantes sensores da direcionalidade da migração celular, afetando diretamente a organização dinâmica do citoesqueleto de actina (SULZMAIER; JEAN; SCHLAEPFER, 2014).

Como podemos observar, HUVECs tratadas com 1000 nM de ALT-C possuem poucos filopódios, além de terem citoesqueletos desorganizados. Entretanto, as células não sofrem uma completa desadesão, provavelmente pela ação de outros receptores de colágeno presentes em suas membranas. Além disso, demonstramos que o tratamento com o anticorpo bloqueador da integrina $\alpha_2\beta_1$ promove alterações morfológicas similares, indicando que os efeitos da desintegrina-símile são oriundos de sua ligação à integrina $\alpha_2\beta_1$ e consequente bloqueio da mesma.

4.6 ALT-C CO-LOCALIZOU COM A INTEGRINA $\alpha_2\beta_1$ EM HUVEC

ALT-C marcada com Alexa Fluor[®]-546 (vermelho) co-localizou com a integrina $\alpha_2\beta_1$ (Alexa Fluor[®]-488, verde) em HUVECs plaqueadas sobre COL1 (Figura 23). Pontos de co-localização entre as duas proteínas podem ser observados em amarelo (Figura 23A-B) e foram quantificados por meio de Coeficiente de Co-localização de Manders (Figura 23C).

Figura 23 - Co-localização entre ALT-C e a integrina $\alpha_2\beta_1$ na superfície celular de HUVECs



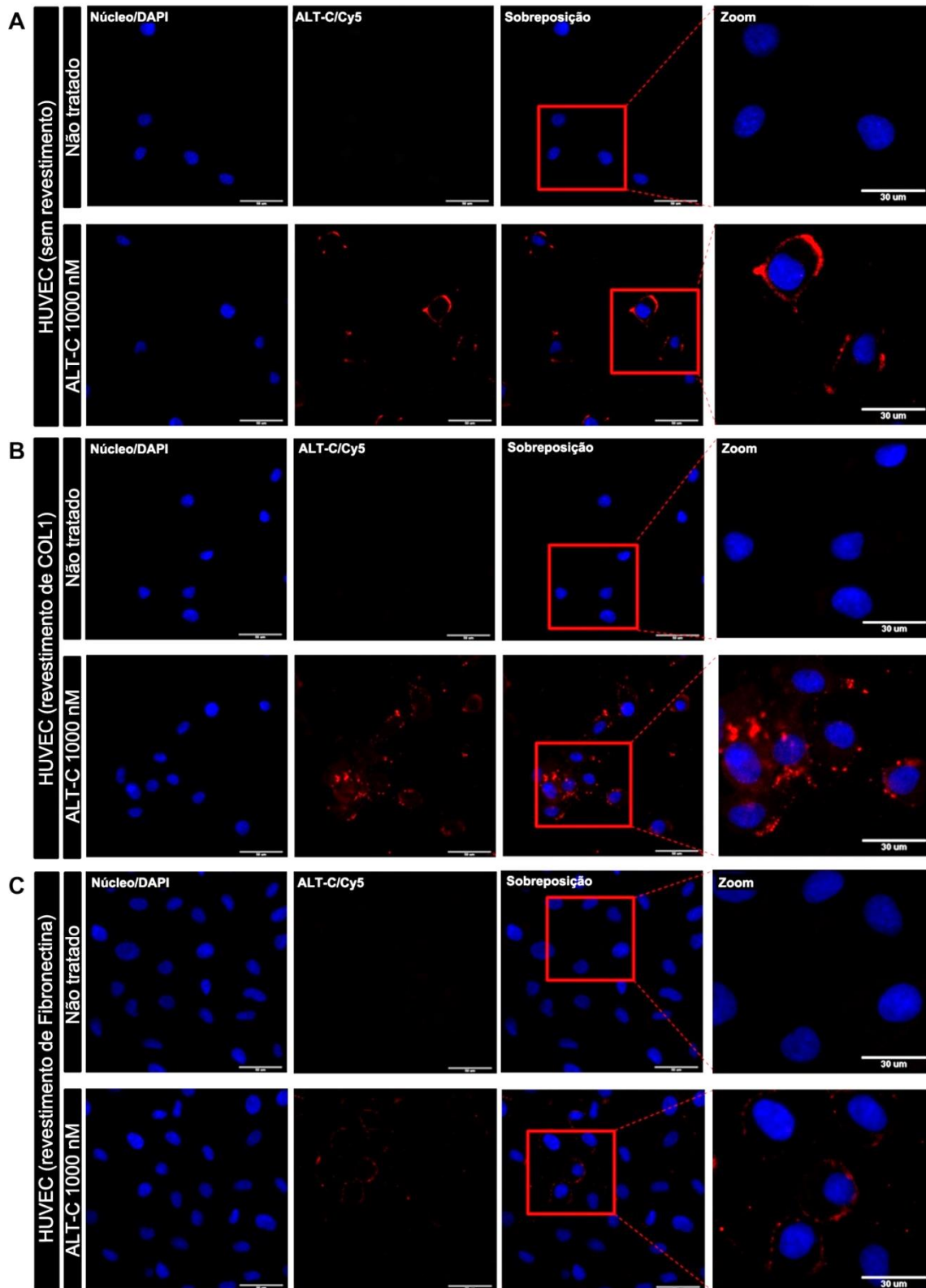
A, Imagens confocais de HUVECs com marcação dupla. Visualização da integrina $\alpha_2\beta_1$ (verde) e de ALT-C (vermelho) em canais separados e sobrepostos. Setas brancas indicam o ponto de co-localização dupla (amarelo) entre as proteínas. Aumento: 63x; barra de escala: 20 μm . **B**, Co-localização (região em amarelo) entre $\alpha_2\beta_1$ -ALT-C demonstrada ortogonalmente por *Z-stacks*. **C**, Coeficiente de Co-localização de Manders (tM1) da ALT-C com a integrina $\alpha_2\beta_1$. O gráfico de dispersão representa a média de $n = 13$ células de três experimentos independentes

A co-localização da ALT-C à integrina $\alpha_2\beta_1$ corroborou nossos resultados anteriores de afinidade entre a proteína e o receptor transmembrana (SOUZA et al., 2000; MORITZ et al., 2018). Resultados similares foram encontrados para desintegrinas-RGD, as quais co-localizaram com a integrina $\alpha_v\beta_3$ em HUVECs e melanomas humanos, também interferindo na angiogênese (RUBTSOV et al., 2016; DANILUCCI et al., 2019). Além disso, AACT, a cadeia C-terminal da lectina tipo C agretina (motivo ECD), co-precipitou com a integrina β_1 em HUVEC, indicando uma interação entre ambas as proteínas (CHUNG et al., 2017). Nossos dados são os primeiros a demonstrarem a co-localização entre uma desintegrina-símile liberada a partir de uma metaloproteinase de peçonha de serpente da classe P-IIIb (SVMP-P-IIIb) e a integrina $\alpha_2\beta_1$ em linhagem celular endotelial.

4.7 ALT-C REVELA MUDANÇAS NO PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DA INTEGRINA $\alpha_2\beta_1$ EM HUVEC DE MANEIRA DEPENDENTE DO REVESTIMENTO PROTEICO

Assumindo-se a ligação da ALT-C à integrina $\alpha_2\beta_1$, nós analisamos a interação entre a desintegrina-símile e a integrina em HUVECs plaqueadas sobre diferentes revestimentos proteicos (*coating*). Para tal, células cultivadas sobre uma fina camada de COL1 ou fibronectina foram tratadas com ALT-C marcada com Alexa Fluor[®]-546 (Figura 24). No experimento em que plaqueamos as HUVECs diretamente sobre o plástico das placas (controle sem revestimento), a ALT-C marcada (1000 nM) se distribuiu de maneira uniforme pelas membranas das células endoteliais, provavelmente ao interagir com a integrina $\alpha_2\beta_1$ em níveis basais (Figura 24A). Nas HUVECs aderidas ao COL1, observamos uma nítida mudança nos sinais de fluorescência da ALT-C, revelando um aspecto agrupado da desintegrina-símile em certas regiões das membranas (Figura 24B). Já nas HUVECs plaqueadas sobre fibronectina, observamos baixas quantidades de ALT-C marcada quando comparado aos grupos controle e plaqueado sobre o COL1 (Figura 24C).

Figura 24 - ALT-C revela mudanças no padrão de distribuição da integrina $\alpha_2\beta_1$ em HUVECs aderidas à diferentes proteínas da matriz extracelular (*coating*)



Células endoteliais foram plaqueadas em placas de 96 poços revestidas com componentes da matriz extracelular e posteriormente tratadas com ALT-C marcada com Alexa Fluor[®]-546 (1000 nM, vermelho) por 15 minutos. Imagens representativas de HUVECs não tratadas e tratadas com ALT-C-AlexaFluor[®]-546 em poços sem revestimento proteico (**A**), revestidos com COL1 (**B**) e revestidos com fibronectina (**C**). Imagens de três experimentos independentes em triplicata foram obtidas através do microscópio *ImageXpress* XLS (Molecular Devices). Aumento: 60x; barras de escala: 50 e 30 μm

Interessantemente, a ligação da ALT-C à integrina $\alpha_2\beta_1$ revelou um padrão distinto de distribuição desta integrina na superfície celular das HUVECs dependente do revestimento proteico no qual estas células estão aderidas. Nossos resultados indicaram que após interagir com o COL1, a integrina $\alpha_2\beta_1$ é ativada e redistribuída pela membrana das células. Essa redistribuição foi observada indiretamente através do aspecto agrupado do sinal fluorescente da ALT-C marcada, revelando que o COL1 promove agrupamento (*clusterização*) da integrina $\alpha_2\beta_1$. Comportamento similar foi descrito recentemente em um estudo no qual a adição de COL1 à monocamadas de HUVECs promoveu a redistribuição de integrinas $\alpha_2\beta_1$ localizadas na superfície celular, com formação de agregados e consequente agrupamento dos receptores (TURNER et al., 2019). Integrinas $\alpha_2\beta_1$ de células epiteliais brônquicas humanas também se agruparam em regiões específicas das membranas celulares quando estas células foram cultivadas sobre COL1 (BRILHA et al., 2018). O presente trabalho sugere que a ALT-C interage com as integrinas $\alpha_2\beta_1$ que foram ativadas pelo COL1 em HUVECs e redistribuídas pelas membranas das células, se associando em *clusters* (grupos). O mesmo padrão não foi observado no grupo controle nem quando as HUVECs foram plaqueadas sobre a fibronectina, uma proteína de matriz não ligante da integrina $\alpha_2\beta_1$, que se liga preferencialmente às integrinas $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ em células endoteliais (KUMAR et al., 2012). Apesar de nossos resultados, este efeito ainda precisa ser confirmado por meio de experimentos com anticorpo anti-integrina $\alpha_2\beta_1$ marcado com fluoróforo.

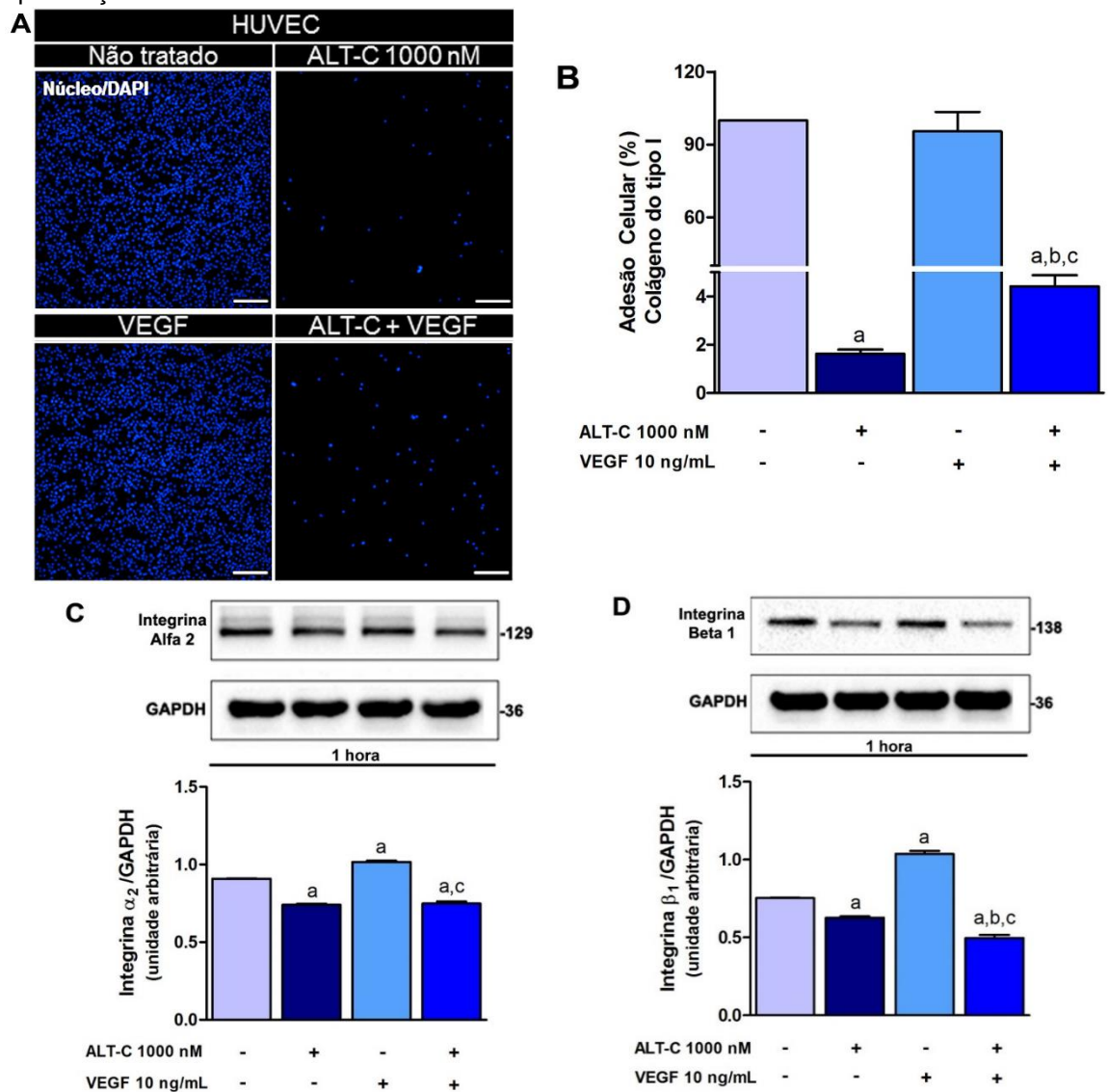
4.8 ALT-C DIMINUIU A ADESÃO CELULAR AO COLÁGENO TIPO 1 E REDUZIU OS NÍVEIS PROTEICOS DE α_2 E β_1 EM HUVEC NA PRESENÇA DE VEGF

A adesão celular à MEC é um passo importante durante a angiogênese e as integrinas são receptores de membrana críticos na mediação desse processo (TABATABAI, 2013; VAN BUUL; GEERTS; HUVENEERS, 2014; KRAYEM et al., 2018). Assim sendo, nós testamos a habilidade da ALT-C de inibir a adesão de HUVECs ao COL1 na presença de VEGF. Células em suspensão foram estimuladas com 10 ng/mL de VEGF e tratadas com 1000 nM de ALT-C antes de serem plaqueadas em poços revestidos com COL1. Como esperado, a ALT-C inibiu consideravelmente a adesão de HUVECs ao COL1 tanto em células não tratadas quanto nas estimuladas com VEGF (98,4% e 95% de inibição, respectivamente). O

VEGF por si só não afetou a adesão celular a essa proteína da MEC (Figura 25A-B).

Em seguida, demonstramos que a ALT-C interfere nos níveis proteicos de α_2 e β_1 em HUVECs não tratadas e estimuladas com VEGF. Na figura 25C-D podemos observar que o VEGF aumentou o conteúdo proteico de α_2 e β_1 enquanto que a ALT-C (1000 nM) diminuiu esse conteúdo em 1 hora de tratamento. A desintegrina-símile também diminuiu os níveis de $\alpha_2\beta_1$ em HUVECs estimuladas com VEGF. Esse resultado corrobora com a hipótese de que a ALT-C interfere com a expressão da integrina $\alpha_2\beta_1$ em HUVECs, diminuindo seus níveis mesmo após estímulo com o fator proangiogênico.

Figura 25 - ALT-C inibe a adesão de HUVECs ao COL1 e diminui os níveis proteicos de $\alpha_2\beta_1$ mesmo na presença de VEGF



A-B, Ensaio de inibição da adesão. HUVECs foram tratadas com ALT-C (1000 nM), VEGF (10 ng/mL) ou ambos por 1 hora em poços recobertos com COL1. Valores de $p < 0.05$ foram considerados com significância estatística: quando comparados aos grupos controle (a), ALT-C (b) e VEGF (c). Todos os

dados foram obtidos de pelo menos três experimentos independentes em triplicata e representados como média \pm erro padrão da média. **C-D**, *Western Blotting* das subunidades α_2 e β_1 de lisados celulares, respectivamente. GAPDH foi utilizado como controle de carregamento. As bandas proteicas foram quantificadas por densitometria (gráficos de coluna) através do software ImageJ (versão 1.51n). Valores de $p < 0.05$ foram considerados com significância estatística: quando comparados aos grupos controle (a), ALT-C (b) e VEGF (c). Todos os dados foram obtidos de pelo menos três experimentos independentes em triplicata e representados como média \pm erro padrão da média

A integrina $\alpha_2\beta_1$ é um dos principais receptores de COL1, proteína abundante na MEC e crucial para os processos de adesão e migração celular e promoção de angiogênese (CHUNG et al., 2017; TURNER et al., 2019). O estudo de Souza e colaboradores (2000) foi o primeiro a reportar a ALT-C como um inibidor de adesão celular ao COL1 através de sua ligação à integrina $\alpha_2\beta_1$ em células K562 transfectadas com esta integrina (SOUZA et al., 2000). Outras proteínas homólogas, advindas de diferentes serpentes, como a atrolisina A (JIA et al., 2000), a catrocolastatina (ZHOU; DANGELMAIER; SMITH, 1996), a jararagina e a jaracetina (DE LUCA et al., 1995; TANJONI et al., 2010), também se ligam à integrina $\alpha_2\beta_1$ inibindo a adesão celular ao COL1. Contudo, este é o primeiro trabalho a demonstrar que a ligação da ALT-C à integrina $\alpha_2\beta_1$ diminui os níveis proteicos de suas subunidades. Esse efeito sugere a possibilidade de ocorrência de internalização e subsequente degradação de integrinas $\alpha_2\beta_1$ em paralelo com a ativação do programa autofágico, o qual também foi induzido pela ALT-C (dados a serem mostrados no item 4.15). Mesmo assim, essa hipótese precisa ser testada experimentalmente por meio de detecção baseada em anticorpos (marcação imunofluorescente da integrina $\alpha_2\beta_1$ para análise em microscópio confocal) ou através de ensaio de co-localização entre a integrina e componentes das vias endocíticas (clatrina, caveolina e complexo polipeptídico adaptador 2, por exemplo), visto que a internalização de integrinas β_1 ocorre principalmente via endocitose mediada por clatrina e caveolina (ARJONEN et al., 2012; DE FRANCESCHI et al., 2016).

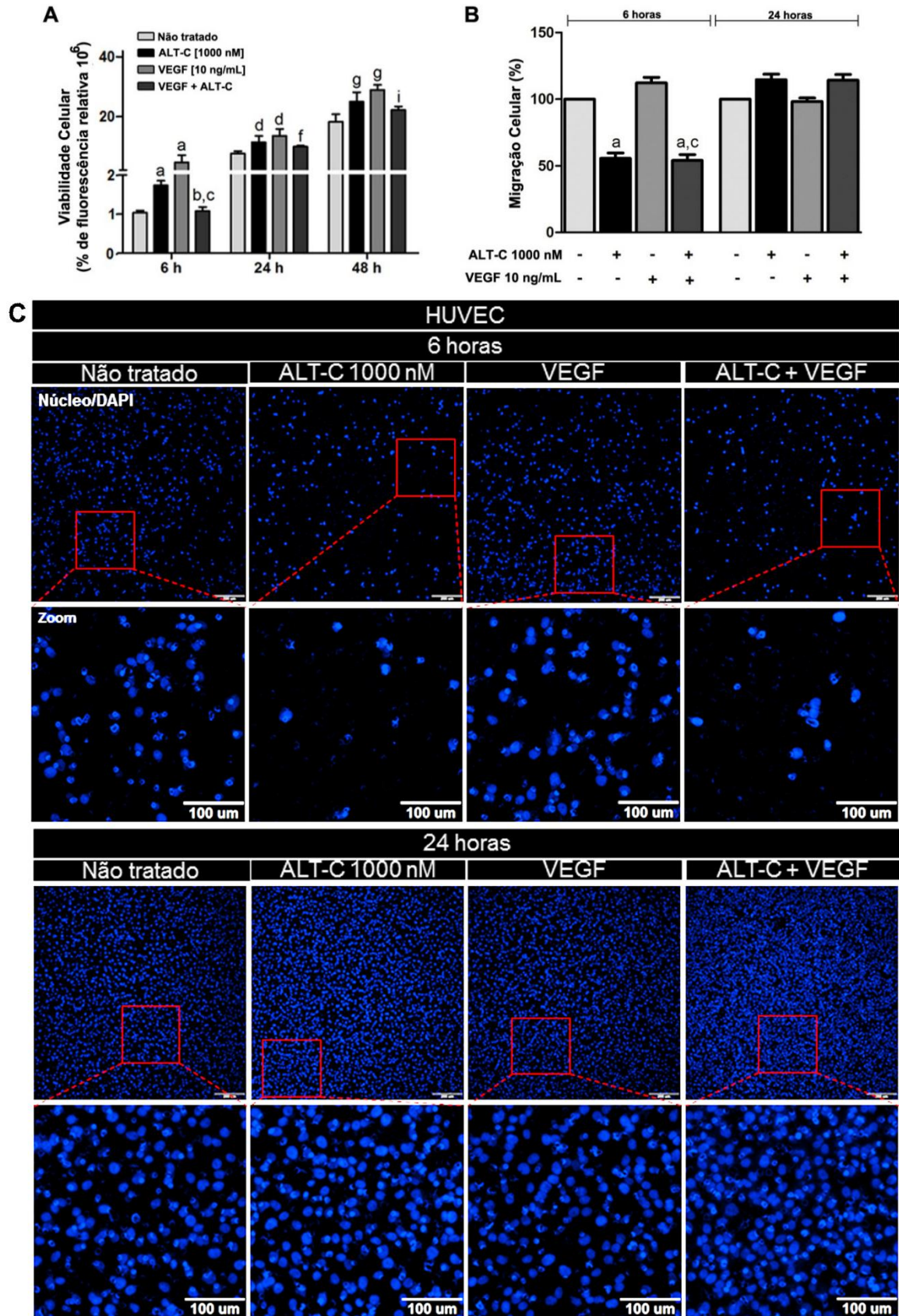
Com relação ao efeito produzido pelo estímulo do VEGF sobre os níveis proteicos da integrina $\alpha_2\beta_1$, nossos resultados confirmaram que o fator proangiogênico aumenta o conteúdo proteico de ambas as subunidades da integrina. A subunidade α_2 é crucial durante a neovascularização e o tratamento com anticorpos bloqueadores de α_2 inibiram a angiogênese associada ao carcinoma de células escamosas (um tipo de câncer de pele) (SENGER et al., 2002). Da mesma maneira, a subunidade β_1 é indispensável para a formação de túbulos e é

necessária na estabilização de vasos sanguíneos durante o processo angiogênico (EHLING et al., 2015). Sabe-se que a integrina $\alpha_2\beta_1$ tem sua sinalização ativada durante a angiogênese dirigida por VEGF, indicativo de uma função proangiogênica para esta integrina, além de confirmar sua participação num *crosstalk* essencial com o VEGFR2, o qual pode ser inibido após bloqueio da integrina (SENGER et al., 2002; MACÊDO; FOX; CASTRO, 2015; CHUNG et al., 2017). Nossos resultados confirmam esta hipótese, ressaltando que a inibição da integrina $\alpha_2\beta_1$ pela ALT-C interfere na ativação do eixo VEGF/VEGFR2.

4.9 ALT-C INIBIU OS PROCESSOS DE VIABILIDADE E MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDOS POR VEGF

Em conjunto com a adesão celular, a viabilidade/proliferação e a migração são processos essenciais durante a cascata angiogênica (HEITZIG et al., 2017; DEWANGAN et al., 2018). Assim sendo, nós estimulamos as HUVECs com VEGF (10 ng/mL) e analisamos os efeitos do tratamento com ALT-C (1000 nM) na viabilidade das células endoteliais aderentes aos poços de placas de cultura sem revestimento proteico. Como esperado, a indução com VEGF aumentou o número de células viáveis em 6, 24 e 48 horas (110%, 78% e 58%, respectivamente). A ALT-C também promoveu crescimento celular quando comparada às células não tratadas (67%; 49%; 37%), indicando que a proteína não induz morte celular. Diferentemente, a desintegrina-símile diminuiu a viabilidade nas HUVECs induzidas com VEGF em todos os tempos testados (50%; 27%; 23%) (Figura 26A). Além disso, células incubadas com ALT-C (1000 nM) por 6 horas apresentaram uma diminuição no processo de migração celular tanto na presença quanto na ausência de VEGF (diminuição de 55,5% e 46%, respectivamente). Essa resposta inibitória não foi observada com o tratamento de 24 horas já que as células voltaram a migrar normalmente (Figura 26B-C), indicativo de internalização e reciclagem das integrinas $\alpha_2\beta_1$ de volta para as membranas das células endoteliais, processo importante para a regulação da migração celular (LAMALICE; LE BOEUF; HUOT, 2007; FRANCESCHI et al., 2015).

Figura 26 - ALT-C inibe os processos de viabilidade e migração celular em HUVECs induzidas com VEGF



A, Ensaio de Viabilidade Celular. HUVECs foram tratadas com ALT-C (1000 nM), VEGF (10 ng/mL) ou ambos por 6, 24 e 48 horas. A viabilidade das células foi analisada pelo método de resazurina (*Alamar Blue*). Valores de $p < 0.05$ foram considerados com significância estatística: quando

comparados aos grupos controle (a), ALT-C (b) e VEGF (c) para 6 horas; quando comparados aos grupos controle (d), ALT-C (e) e VEGF (f) para 24 horas e quando comparados aos grupos controle (g), ALT-C (h) e VEGF (i) para 48 horas. Todos os dados foram obtidos de pelo menos três experimentos independentes em triplicata e representados como média \pm erro padrão da média. **B**, Ensaio de Migração. As células que migraram foram fixadas, seus núcleos marcados com DAPI e contados no sistema *ImageXpress XLS* (Molecular Devices) após tratamento com 1000 nM de ALT-C (6 e 24 horas). Valores de $p < 0.05$ foram considerados com significância estatística: quando comparados aos grupos controle (a), ALT-C (b) e VEGF (c). Todos os dados foram obtidos de pelo menos três experimentos independentes em triplicata e representados como média \pm erro padrão da média. **C**, Imagens representativas do ensaio de Migração Celular. Núcleos (azul) foram marcados com o fluoróforo DAPI

A ALT-C foi capaz de inibir diversas etapas da cascata angiogênica como a adesão, a viabilidade e a migração celular, etapas estas induzidas pelo VEGF. Como demonstrado em estudos anteriores, várias moléculas advindas de peçonhas de serpente como a lectina AACT (CHUNG et al., 2017), a desintegrina-símile leucurogina (ALMEIDA et al., 2019), a SVMMP BpMP-II (ACHÊ et al., 2015) e desintegrinas não-RGD (OLIVEIRA et al., 2018) têm efeitos similares, inibindo a viabilidade e a migração, prejudicando o processo angiogênico. Adicionalmente, a ALT-C interfere na resposta do VEGF, diminuindo seu efeito indutor na viabilidade e na migração das HUVECs, sugerindo, mais uma vez, que o bloqueio da integrina $\alpha_2\beta_1$ compromete a sinalização do eixo VEGF/VEGFR2.

4.10 ALT-C INIBIU A FORMAÇÃO DE TÚBULOS EM HUVEC

A tubulogênese é um passo crucial durante a angiogênese (TUNG; TATTERSALL; KITAJEWSKI, 2011) e, portanto, nós analisamos os efeitos da ALT-C na formação de túbulos em HUVECs estimuladas ou não com VEGF. Na figura 27A podemos observar que células induzidas ou não com VEGF formam uma rede tubular que simula vasos endoteliais *in vitro*, produzindo estruturas similares a capilares. Já os tratamentos com 200 e 1000 nM de ALT-C afetaram a estruturação dos túbulos, os quais apresentaram-se esparsos e em pequena quantidade, prejudicando a completa formação da trama tubular. Interessantemente, a incubação com 500 nM de ALT-C, tanto na ausência quanto na presença de VEGF, tendeu a um efeito proangiogênico, indicando que neste experimento, o efeito da desintegrina-símile segue uma curva de sino (*inibição – estímulo – inibição*).

Cinco parâmetros diferentes relacionados à tubulogênese foram analisados com o intuito de avaliar o potencial antiangiogênico da ALT-C: comprimento dos túbulos, ramificação dos túbulos, número de junções, malha

tubular e Índice Angiogênico (área analisada x ramificação dos túbulos x malha tubular). Nas concentrações de 200 e 1000 nM, a desintegrina-símile foi capaz de diminuir todos os parâmetros testados tanto na ausência quanto na presença de VEGF (Figura 27B-F; Tabela 2). Segundo o Índice Angiogênico calculado, a ALT-C na concentração de 1000 nM se mostrou a mais potente em diminuir o processo angiogênico (Figura 27F; Tabela 2). A ALT-C na concentração de 500 nM tende a aumentar o comprimento e a ramificação dos túbulos, incluindo o número de junções, mas não houve significativa diferença estatística quando comparamos os resultados obtidos com os grupos controle e induzido com VEGF.

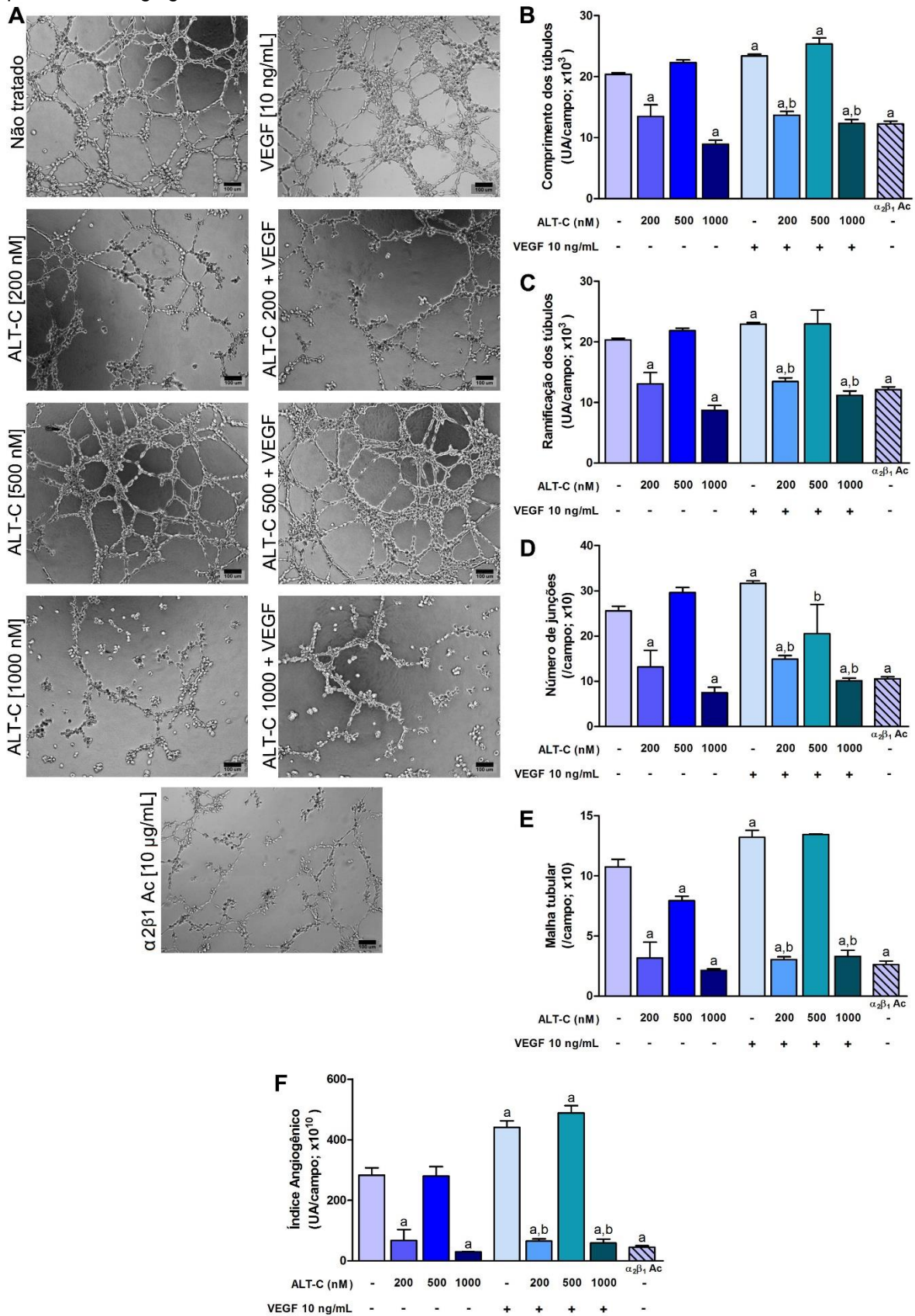
Como esperado, o estímulo promovido pelo VEGF levou ao aumento do comprimento (15%) e da ramificação dos túbulos (13%), do número de junções (24%) e da malha tubular (23%), aumentando o Índice Angiogênico (em 56%) quando comparado com o grupo não tratado, enquanto que o tratamento com o anticorpo $\alpha_2\beta_1$, utilizado como bloqueador da integrina, inibiu todos os parâmetros testados (em 42%, 43%, 62%, 77% e 86%, respectivamente) (Figura 27), tendo efeito similar ao obtido pelos tratamentos com 200 e 1000 nM de ALT-C.

Tabela 2 – ALT-C (200 e 1000 nM) inibiu todos os parâmetros angiogênicos testados no ensaio de tubulogênese

	Porcentagens de Inibição da Tubulogênese			
	ALT- 200 nM (ausência de VEGF)	ALT-C 1000 nM (ausência de VEGF)	ALT-C 200 nM (presença de VEGF)	ALT-C 1000 nM (presença de VEGF)
Comprimentos dos túbulos	34%	56%	41%	47%
Ramificação dos túbulos	36%	57%	41%	51%
Número de junções	49%	71%	53%	69%
Malha tubular	71%	80%	77%	75%
Índice Angiogênico	76%	90%	85%	87%

ALT-C (200 e 1000 nM) inibiu o comprimento dos túbulos, a ramificação dos túbulos, o número de junções, a malha tubular e o Índice Angiogênico de células endoteliais na ausência ou presença de VEGF. Todos os dados estão representados como porcentagem de inibição e foram calculados utilizando o *plugin 'Angiogenesis Analyzer'* (software ImageJ Fiji, versão 1.52g). Os ensaios foram repetidos pelo menos três vezes em triplicata

Figura 27 - ALT-C (200 e 1000 nM) inibe a tubulogênese em HUVECs, diminuindo diversos parâmetros angiogênicos



A, Imagens representativas do ensaio de tubulogênese. Aumento: 10x; barra de escala: 100 µm. HUVECs foram tratadas por 30 minutos com ALT-C (200, 500 e 1000 nM), VEGF (10 ng/mL), VEGF +

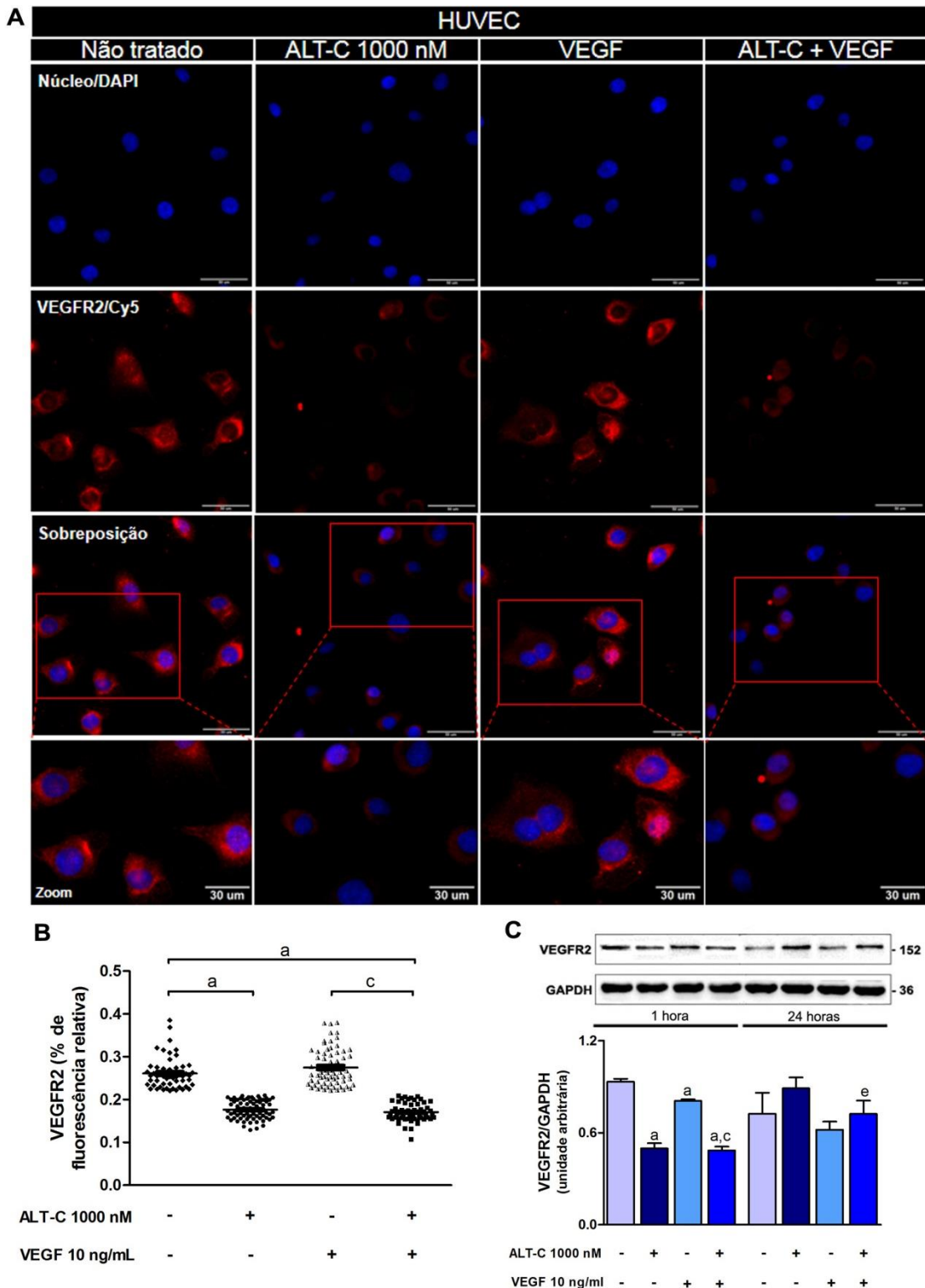
ALT-C ou anticorpo bloqueador da integrina $\alpha_2\beta_1$ (controle negativo) e então plaqueadas sobre matrigel-GFR por 14 horas. **B**, Comprimento dos túbulos (UA/campo), **C**, Ramificação dos túbulos (UA/campo), **D**, Número de junções (/campo), **E**, Malha tubular (/campo) e **F**, Índice Angiogênico (Área analisada x Ramificação dos túbulos x Total de malha tubular; UA/campo) foram calculados utilizando o *plugin 'Angiogenesis Analyzer'* (software ImageJ Fiji, versão 1.52g). Valores de $p < 0.05$ foram considerados com significância estatística: quando comparados aos grupos controle (a) e VEGF (b). Todos os dados foram representados como média \pm erro padrão da média. Os ensaios foram repetidos pelo menos três vezes em triplicata

Outras SVMPs foram descritas como inibidoras da formação de túbulos em células endoteliais. BpMP-II (10 $\mu\text{g/mL}$; SVMP-PI), bothropoidina (40 $\mu\text{g/mL}$; desintegrina-símile) e neuwiedina (1250 nM; SVMP-PII) diminuíram a tubulogênese em células endoteliais murinas *tEnd* (endotélio tímico) (ACHÊ et al., 2015; LIMA-DOS-SANTOS et al., 2015; GUIMARÃES et al., 2017). Já a leucurogina, uma desintegrina-símile ECD purificada da peçonha de *Bothrops leucurus*, inibiu o processo de formação de túbulos em HUVECs (ALMEIDA et al., 2019), mas diferente da ALT-C, esta inibição ocorreu na concentração de 4800 nM, uma dose quase 5x maior do que a mais potente (1000 nM) utilizada neste trabalho.

4.11 ALT-C DIMINUIU O CONTEÚDO PROTEICO DE VEGFR2 EM HUVEC

O VEGF exerce suas funções biológicas ao se ligar em seus receptores, principalmente o VEGFR2 (ZHANG et al., 2016). Sabendo-se da importância desse receptor na promoção de angiogênese, nós analisamos o efeito da ALT-C sobre seu conteúdo proteico em HUVECs. Primeiramente, nós observamos que 1000 nM de ALT-C diminuiu a intensidade de fluorescência de VEGFR2 total quando comparado às células endoteliais não tratadas e estimuladas com VEGF, plaqueadas sobre uma camada de COL1 (35% e 41% de diminuição, respectivamente) (Figura 28A-B). Este resultado indicou que o efeito inibitório da ALT-C é mais efetivo do que o efeito proangiogênico e indutor do VEGF, sugerindo que o bloqueio da integrina $\alpha_2\beta_1$ pela desintegrina-símile afeta a interação VEGF/VEGFR2. Para comprovar esta possibilidade, nós analisamos o conteúdo proteico de VEGFR2 total por *Western Blotting*. A incubação por 1 hora com ALT-C (1000 nM) diminuiu os níveis proteicos de VEGFR2 tanto em células não tratadas quanto em células tratadas com VEGF (Figura 28C). O conteúdo proteico do receptor voltou aos seus níveis normais após tratamento de 24 horas com ALT-C, indicando que o efeito da desintegrina-símile ocorre em um período curto de tempo.

Figura 28 - ALT-C diminui o conteúdo proteico de VEGFR2 total em HUVECs

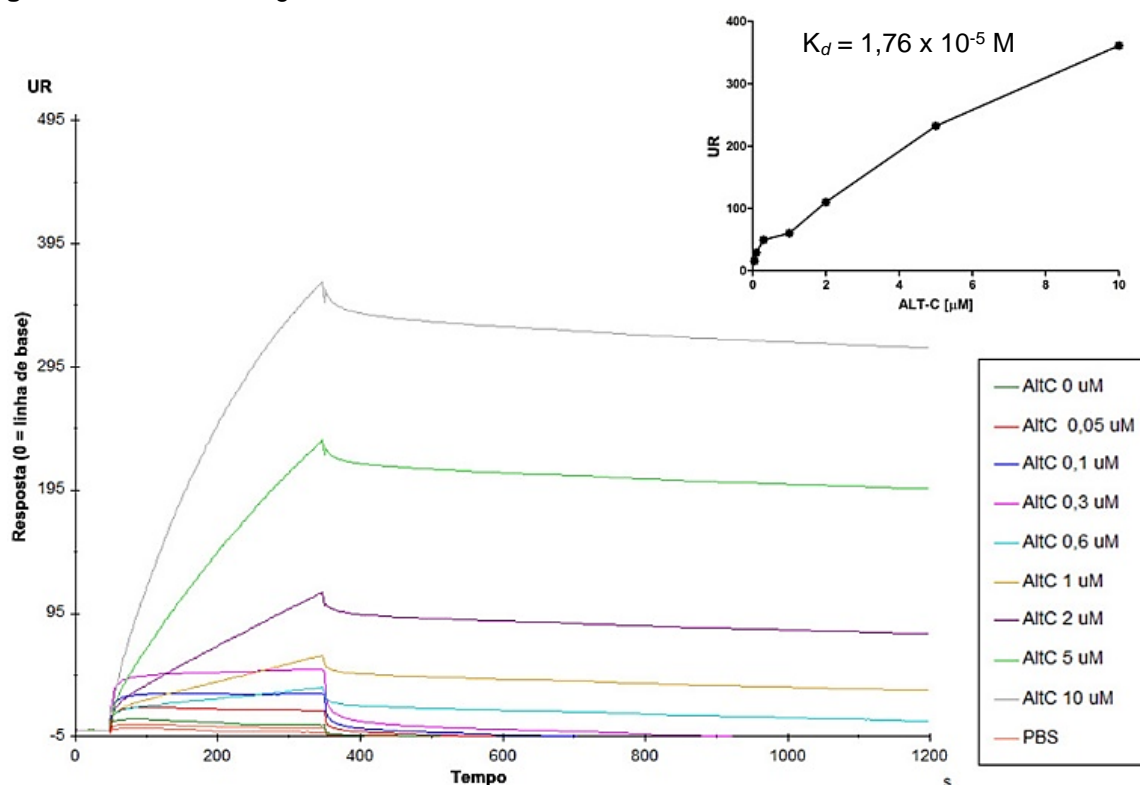


A, Imagens representativas da detecção imunofluorescente da proteína VEGFR2 (aumento: 60x; barras de escala: 50 e 30 μ m). HUVECs foram tratadas com ALT-C (1000 nM), VEGF (10 ng/mL) ou ambos durante 30 minutos, seguido de incubação com anticorpo primário anti-VEGFR2 e anticorpo secundário APC. Núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). VEGFR2 é mostrado em vermelho (Cy5). **B**, ALT-C diminuiu a porcentagem de fluorescência relativa de VEGFR2, a qual foi calculada como intensidade média de vesículas por intensidade média de núcleos (gráfico de dispersão). Valores de $p < 0.05$ foram considerados com significância estatística: quando comparados aos grupos controle (a), ALT-C (b) e VEGF (c). Todos os dados foram obtidos de pelo menos três

experimentos independentes em triplicata e representados como média \pm erro padrão da média. **C**, *Western Blotting* da proteína VEGFR2, após tratamento das células com ALT-C (1000 nM), VEGF (10 ng/mL) ou ambos por 1 e 24 horas. GAPDH foi utilizado como controle de carregamento. As bandas proteicas foram quantificadas por densitometria (gráfico de coluna) através do software ImageJ (versão 1.51n). Valores de $p < 0.05$ foram considerados com significância estatística: quando comparados aos grupos controle (a), ALT-C (b) e VEGF (c) para 1 hora e quando comparados aos grupos controle (d), ALT-C (e) e VEGF (f) para 24 horas. Todos os dados foram representados como média \pm erro padrão da média. Os ensaios foram repetidos pelo menos três vezes em triplicata

Adicionalmente, uma possível ligação direta entre a ALT-C e o VEGFR2 foi avaliada por Ressonância Plasmônica de Superfície (RPS). A desintegrina-símile se ligou ao VEGFR2 com uma constante de dissociação (K_d) de $1,76 \times 10^{-5}$ M (Figura 29), tendo uma afinidade dez vezes menor pelo receptor proangiogênico quando comparada à sua afinidade pela integrina $\alpha_2\beta_1$ ($K_d = 1,4 \times 10^{-6}$ M) (MORITZ et al., 2018). Em contrapartida, a afinidade da proteína pelo VEGFR2 é três vezes maior do que a demonstrada para com o COL1 ($K_d = 4.8 \times 10^{-5}$ M) (MORITZ et al., 2018). Cabe ressaltar que não detectamos qualquer ligação entre a ALT-C e a integrina $\alpha_1\beta_1$ (dados não mostrados), outro receptor de COL1 e de COL4 presente nas células endoteliais (GULLBERG et al., 1992; SENGER et al., 1997), indicando a especificidade da desintegrina-símile pela integrina $\alpha_2\beta_1$. Além disso, a ALT-C não se ligou ao COL4, à laminina e à vitronectina imobilizados nos *chips* de RPS (dados não mostrados), ressaltando sua interferência na adesão das células endoteliais ao COL1 via bloqueio da integrina $\alpha_2\beta_1$.

Figura 29 - ALT-C interage com o VEGFR2



Concentrações crescentes de ALT-C (0 μ M – 10 μ M) ligando-se ao VEGFR2 imobilizado no chip CM5 (GE Healthcare). O sensograma representativo e a curva cinética estão mostrados na imagem. $K_d = 1,76 \times 10^{-5}$ M. UR = unidade de ressonância

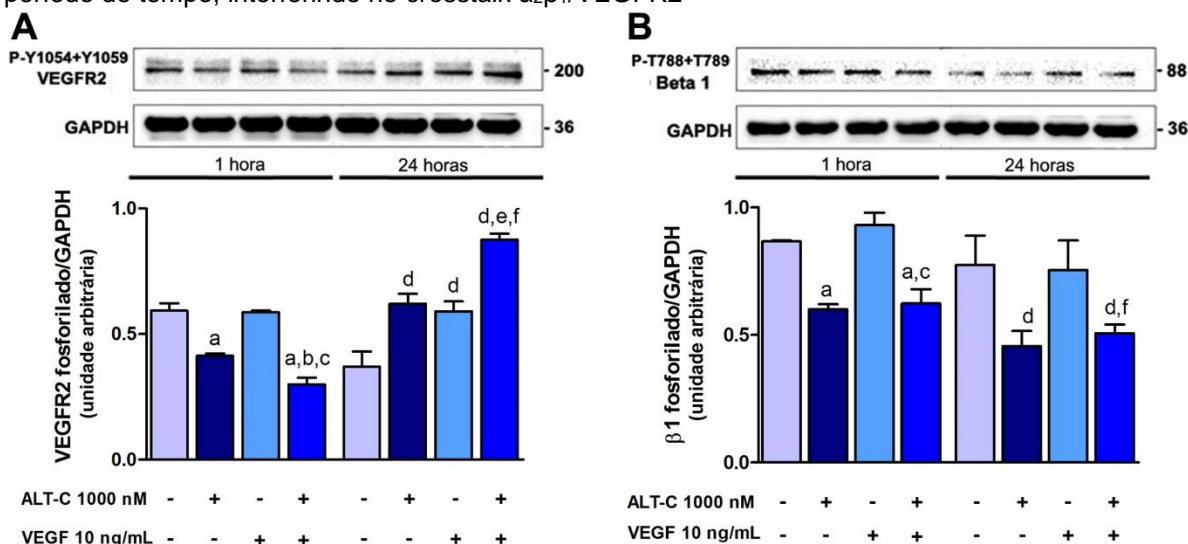
Assim como observado para a ALT-C, dados na literatura mostraram que o anticorpo monoclonal humano anti-VEGFR2 TTAC-001 e os polissacarídeos sulfatados FP08S2 e JCS1S2 também têm a capacidade de se ligarem ao VEGFR2 ($K_d = 7,3 \times 10^{-5}$ M; $K_d = 3,3 \times 10^{-8}$ M e $K_d = 4,82 \times 10^{-9}$ M, respectivamente), interferindo no eixo VEGF/VEGFR2 e conseqüentemente diminuindo o processo angiogênico (LEE et al., 2015; CHEN et al., 2016a; WANG et al., 2018).

4.12 ALT-C INTERFERIU NO CROSSTALK $\alpha_2\beta_1$ /VEGFR2

A ligação do VEGF ao VEGFR2 promove a formação de um complexo com a integrina β_1 seguido de ativação do receptor (SIMONS; GORDON; CLAEISSON-WELSH, 2016). O bloqueio das integrinas $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_1\beta_1$ inibe a angiogênese induzida por VEGF, sugerindo a existência de um *crosstalk* entre β_1 e a sinalização do VEGFR2 (SENGER et al., 2002; CHUNG et al., 2017). Assim sendo, nós avaliamos a capacidade da ALT-C de interferir nesse *crosstalk* em HUVECs aderidas em poços sem revestimento proteico (sem *coating*).

A fosforilação da proteína VEGFR2 foi significativamente diminuída pela ALT-C (1000 nM) em 1 hora de tratamento tanto em células não tratadas quanto nas estimuladas com VEGF (Figura 30A). Surpreendentemente, a desintegrina-símile promoveu a fosforilação do VEGFR2 no tempo de 24 horas e esse efeito foi ainda maior em células tratadas com VEGF (Figura 30A). Igualmente, a ALT-C diminuiu a fosforilação de β_1 em HUVECs não tratadas e em HUVECs induzidas por VEGF no tempo de 1 hora, mantendo a mesma resposta em 24 horas (Figura 30B), o que sugere que a integrina $\alpha_2\beta_1$ exerce um nítido controle na sinalização do VEGFR2, já que sua inibição pela ALT-C interferiu em seu *crosstalk* com o receptor proangiogênico, diminuindo a fosforilação do mesmo.

Figura 30 - ALT-C inibe a fosforilação de VEGFR2 e de β_1 após estimulação com VEGF em um curto período de tempo, interferindo no *crosstalk* $\alpha_2\beta_1$ /VEGFR2



A-B, *Western Blotting* de VEGFR2 fosforilado e da integrina β_1 fosforilada, respectivamente. HUVECs foram tratadas com ALT-C (1000 nM), VEGF (10 ng/mL) ou ambos por 1 e 24 horas e os *blots* foram incubados com os anticorpos P-Y1054+Y1059 VEGFR2 e P-T788+T789 β_1 . GAPDH foi utilizado como controle de carregamento. As bandas proteicas foram quantificadas por densitometria (gráficos de coluna) através do software ImageJ (versão 1.51n). Valores de $p < 0.05$ foram considerados com significância estatística: quando comparados aos grupos controle (a), ALT-C (b) e VEGF (c) para 1 hora e quando comparados aos grupos controle (d), ALT-C (e) e VEGF (f) para 24 horas. Todos os dados foram representados como média \pm erro padrão da média. Os ensaios foram repetidos pelo menos três vezes em triplicata

Estudos mostraram que a proteína homodimérica VEGF é o principal indutor das angiogêneses fisiológica e tumoral, sendo considerado um alvo interessante na terapêutica anticâncer (RAMJAWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017). Anticorpos anti-VEGF, como o bevacizumabe, foram desenvolvidos para o tratamento da angiogênese associada à progressão tumoral e à metástase. Contudo, a eficácia terapêutica esperada para esses antiangiogênicos é suprimido

pelo desenvolvimento de resistência, o qual é um desafio a ser superado (RAMJAWAN; GRIFFIOEN; DUDA, 2017; KUCZYNSKI et al., 2019). Ao se ligar ao receptor VEGFR2, o VEGF estimula diversas vias de sinalização como a da ERK 1/2 e da PI3K e a via de fosforilação FAK-Src/paxilina, as quais são importantes para o correto funcionamento fisiológico do processo angiogênico (TANG et al., 2016; PEACH et al., 2018; THIELTGES et al., 2018). De maneira interessante, muitas dessas vias são inibidas após bloqueio da integrina $\alpha_2\beta_1$, confirmando o importante papel dessa integrina no controle da cascata angiogênica (SENGER et al., 1997; HODIVALA-DILKE; REYNOLDS; REYNOLDS, 2003; CRUZ DA SILVA et al., 2019).

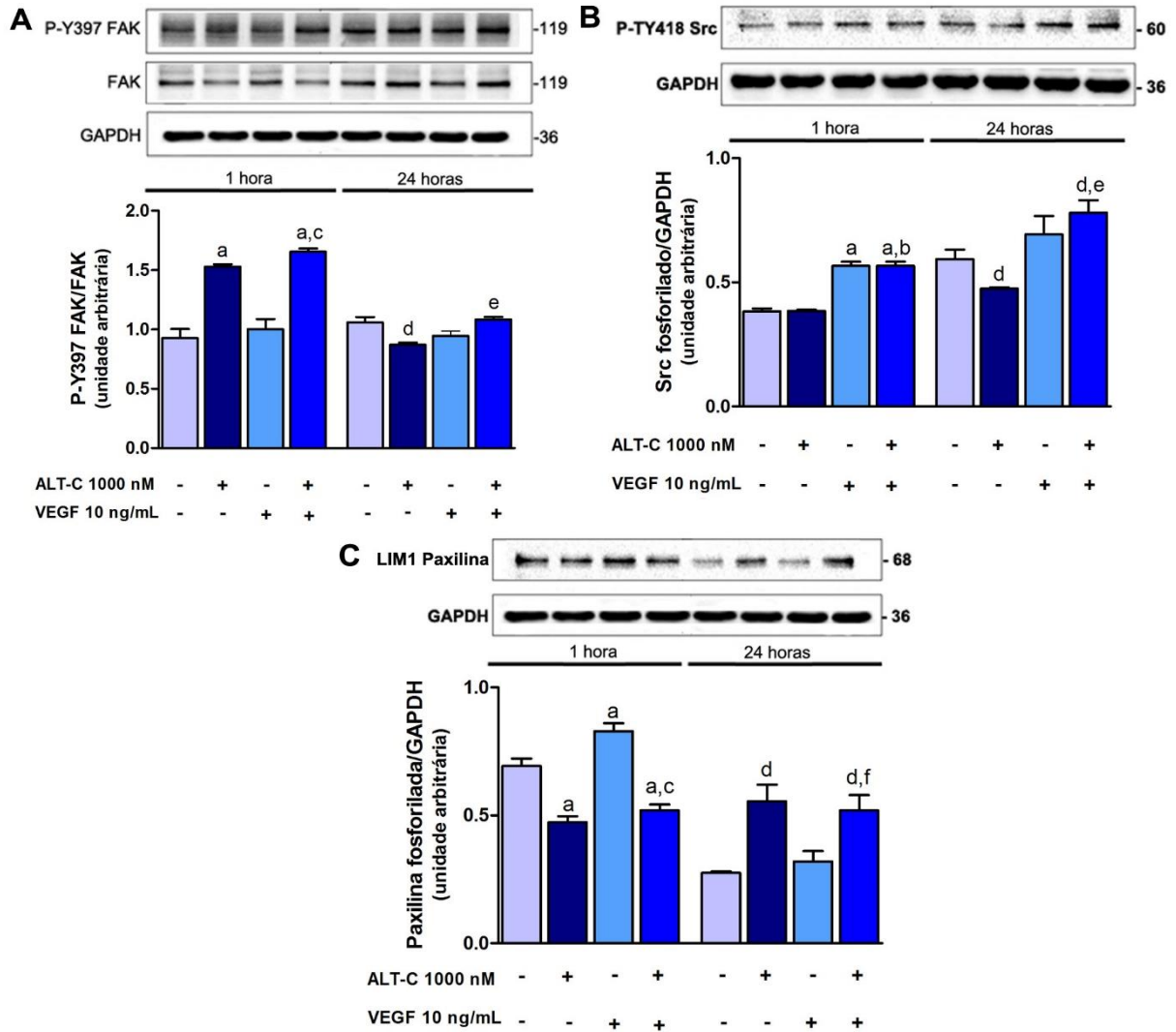
Moléculas como a lectina C AACT, a sulfonamida E7820 e a proteína angiocidina bloquearam a integrina $\alpha_2\beta_1$, levando à diminuição da expressão de VEGFR2 e interferindo no *crosstalk* entre a integrina e o receptor proangiogênico, com subsequente comprometimento na formação de túbulos e na promoção de angiogênese (FUNAHASHI et al., 2002; SABHERWAL et al., 2006; CHUNG et al., 2017) da mesma maneira que o tratamento com a ALT-C (1000 nM) descrito no presente trabalho. Estes dados ressaltam a importância de nossos resultados nos estudos de inibição de integrinas tendo como foco a supressão do processo angiogênico associado ao tumor.

4.13 ALT-C INTERFERIU NA SINALIZAÇÃO DE FAK/SRC E PAXILINA EM HUVEC

Considerando que o tratamento com ALT-C diminuiu a adesão e a migração celular e provocou alterações morfológicas nas células endoteliais, nós investigamos seus efeitos na sinalização de FAK/Src e paxilina em HUVECs (sem *coating*), visto que essas proteínas estão envolvidas em ambos os processos citados (CUI et al., 2017). A estimulação induzida pelo VEGF não afetou a fosforilação de FAK, mas aumentou Src e paxilina no tempo de 1 hora, não tendo resposta significativa em 24 horas de tratamento (Figura 31). Em células tratadas com ALT-C (1000 nM), tivemos a diminuição da fosforilação de paxilina, mas a ativação de FAK em 1 hora. Nenhuma alteração foi observada nos níveis de Src neste tempo (Figura 31). Resposta diferente foi observada no tratamento de 24 horas. Neste período, ALT-C (1000 nM) diminuiu as fosforilações de FAK e Src, mas aumentou os níveis de paxilina (Figura 31). Na presença de VEGF, nós observamos que o tratamento com ALT-C (1000 nM) aumentou a fosforilação de FAK apenas no tempo de 1 hora.

Os níveis de paxilina, no entanto, diminuíram em 1 hora, aumentando em 24 horas de incubação com a desintegrina-símile (Figura 31).

Figura 31 - ALT-C interfere na sinalização de FAK/Src e Paxilina mediada por VEGF

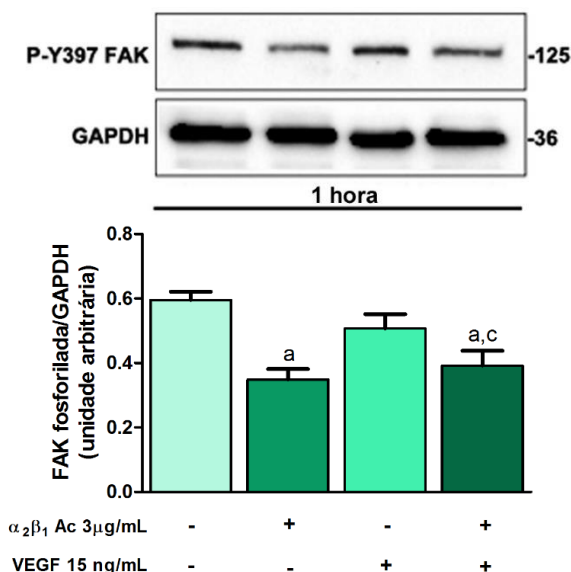


Western Blotting de ³⁹⁷Y-FAK/FAK (A), ⁴¹⁸P-TY-Src (B) e ^{LIM1}paxilina (C), após tratamento das células com ALT-C (1000 nM), VEGF (10 ng/mL) ou ambos por 1 e 24 horas. GAPDH foi utilizado como controle de carregamento. As bandas proteicas foram quantificadas por densitometria (gráficos de coluna) através do software ImageJ (versão 1.51n). Valores de $p < 0.05$ foram considerados com significância estatística: quando comparados aos grupos controle (a), ALT-C (b) e VEGF (c) para 1 hora e quando comparados aos grupos controle (d), ALT-C (e) e VEGF (f) para 24 horas. Todos os dados foram representados como média \pm erro padrão da média. Os ensaios foram repetidos pelo menos três vezes em triplicata

Nós também analisamos a fosforilação de FAK em HUVECs tratadas com anticorpo bloqueador (Ac) da integrina $\alpha_2\beta_1$. Após 1 hora de incubação com este anticorpo, a fosforilação de FAK diminuiu quando comparada a HUVECs induzidas ou não pelo VEGF (Figura 32), resposta contrária aquela que observamos quando

tratamos as células com ALT-C (1000 nM). Outros estudos corroboram com nossos achados, mostrando que a desintegrina-símile ativa a fosforilação de FAK em células tumorais de mama MDA-MB-231 (10 nM) e em neutrófilos (100 nM) (MARIANO-OLIVEIRA et al., 2003; MORITZ et al., 2018).

Figura 32 - Tratamento com anticorpo bloqueador da integrina $\alpha_2\beta_1$ inibiu a fosforilação de FAK em HUVECs num período curto de tempo



Western Blotting de FAK fosforilada. HUVECs foram tratadas com anticorpo bloqueador da integrina $\alpha_2\beta_1$ (3 μ g/mL), VEGF (15 ng/mL) ou ambos por 1 hora e os *blots* foram incubados com o anticorpo P -Y³⁹⁷FAK. GAPDH foi utilizado como controle de carregamento. As bandas proteicas foram quantificadas por densitometria (gráficos de coluna) através do software ImageJ (versão 1.51n). Valores de $p < 0.05$ foram considerados com significância estatística: quando comparados aos grupos controle (a), Ac bloqueador de $\alpha_2\beta_1$ (b) e VEGF (c). Todos os dados foram representados como média \pm erro padrão da média. Os ensaios foram repetidos pelo menos três vezes em triplicata

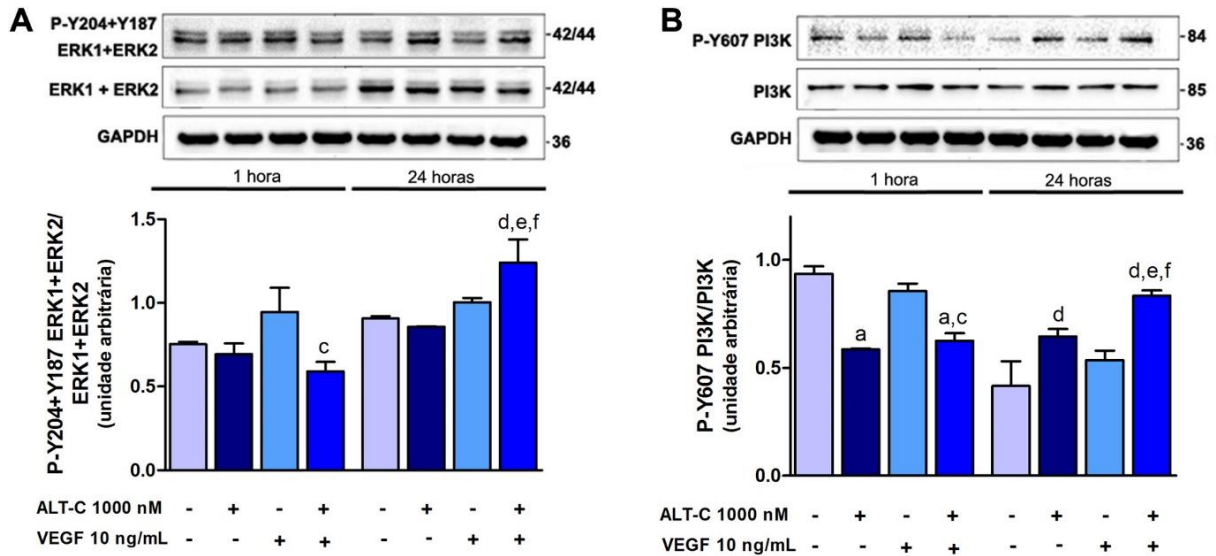
A FAK endotelial é necessária para o desenvolvimento da angiogênese tumoral (TAVORA et al., 2010). FAK é a principal tirosina quinase intracelular que medeia a transdução de sinal das integrinas, também participando da sinalização ativada pelo VEGF ao se ligar no VEGFR2. Em conjunto com Src, o receptor de esteroide pertencente à família das tirosina-quinases, a FAK inicia diversas cascatas de fosforilação, regulando a migração, a proliferação, a motilidade e a sobrevivência das células endoteliais, recrutando proteínas como a paxilina, uma proteína de citoesqueleto que coordena a adesão celular (KING et al., 2014; CUI et al., 2017; SUN; WU; GUAN, 2018). Curiosamente, a ALT-C (1000 nM) ativou a fosforilação de FAK-Y397 (resíduo de tirosina 397) e diminuiu a fosforilação de paxilina em HUVECs no tempo de 1 hora. Esse resultado corrobora com um estudo recente que demonstrou que a ativação de FAK-Y397 em células endoteliais reduz a expressão

de VEGFR2 e também a ativação da integrina β_1 , prejudicando a sinalização de FAK/Src/PI3K/Akt (PEDROSA et al., 2019). Ao contrário, a ativação de FAK-Y861 (resíduo de tirosina 861) diminuiu a expressão de VEGFR2, mas aumentou a ativação da integrina β_1 (PEDROSA et al., 2019). Esses dados nos permitem entender como a ALT-C inibe a angiogênese apesar de ativar FAK após se ligar à integrina $\alpha_2\beta_1$, além de sugerir que a desintegrina-símile age como um agonista inverso, o qual interage com a integrina $\alpha_2\beta_1$, induzindo uma resposta farmacológica oposta à de um agonista típico (ROSE; GOLAN, 2009).

Moléculas que perturbam a interação entre FAK-Src e paxilina inibem a proliferação e a migração celular durante o processo angiogênico, prejudicando a formação de adesões focais e de filopódios nas células (FU et al., 2015; TOUTOUNCHIAN et al., 2016; CUI et al., 2017). Ao diminuir a fosforilação de paxilina em 1 hora e a fosforilação de FAK em 24 horas, a ALT-C interfere na via FAK-Src/paxilina, inibindo a adesão e a migração de HUVECs, alterando a morfologia dessa linhagem celular. Como visto, os filopódios das células endoteliais diminuem após tratamento com ALT-C (1000 nM). A montagem dessas estruturas morfológicas depende da fosforilação de paxilina, a qual ativa a GTPase Rho. Sob baixa expressão de paxilina, as células perdem suas adesões focais e fibras de estresse, comprometendo a formação de filopódios (FU et al., 2015), assim como observamos nas HUVECs tratadas com ALT-C que apresentaram baixos níveis de paxilina fosforilada. Este resultado sugere desadesão parcial das células, processo conhecido por ativar o programa autofágico.

4.14 ALT-C INIBIU A ATIVAÇÃO DAS VIAS DE ERK1/2 E PI3K MEDIADAS PELO VEGFR2 EM HUVEC

O tratamento por 1 hora com ALT-C (1000 nM) diminuiu as fosforilações de ERK 1/2 e PI3K em HUVECs estimuladas com VEGF (Figura 33). Entretanto, em 24 horas, observamos uma resposta diferente com elevação dos níveis de ambas as proteínas (Figura 33). Este resultado sugere que o efeito antiangiogênico promovido pela ALT-C após ligação na integrina $\alpha_2\beta_1$ é tempo-dependente.

Figura 33 - ALT interfere na sinalização de ERK 1/2 e PI3K mediada por VEGF

Western Blotting de P-Y204+Y187 ERK1+ERK2/ERK (A) e P-Y607 PI3K/PI3K (B), após tratamento das células com ALT-C (1000 nM), VEGF (10 ng/mL) ou ambos por 1 e 24 horas. GAPDH foi utilizado como controle de carregamento. As bandas proteicas foram quantificadas por densitometria (gráficos de coluna) através do software ImageJ (versão 1.51n). Valores de $p < 0.05$ foram considerados com significância estatística: quando comparados aos grupos controle (a), ALT-C (b) e VEGF (c) para 1 hora e quando comparados aos grupos controle (d), ALT-C (e) e VEGF (f) para 24 horas. Todos os dados foram representados como média \pm erro padrão da média. Os ensaios foram repetidos pelo menos três vezes em triplicata

ERK 1/2 (p44/p42) pertence à superfamília das quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e é obtida por *splicing* alternativo, sendo considerada um dos principais efetores da oncoproteína Ras, além de induzir a liberação de metaloproteínas de matriz que ajudam na degradação da MEC (DONG et al., 2017; LIU et al., 2018). Já a proteína PI3K pertence à família das quinases lipídicas, sendo a classe IA associada à angiogênese tumoral (DE LUCA et al., 2012; ZHANG et al., 2015). Ambas as proteínas são ativadas por fatores de crescimento (como o VEGF) e modulam a proliferação, a migração, a invasão e a tubulogênese de células endoteliais (TANG et al., 2016; CHUNG et al., 2017; LIU et al., 2018).

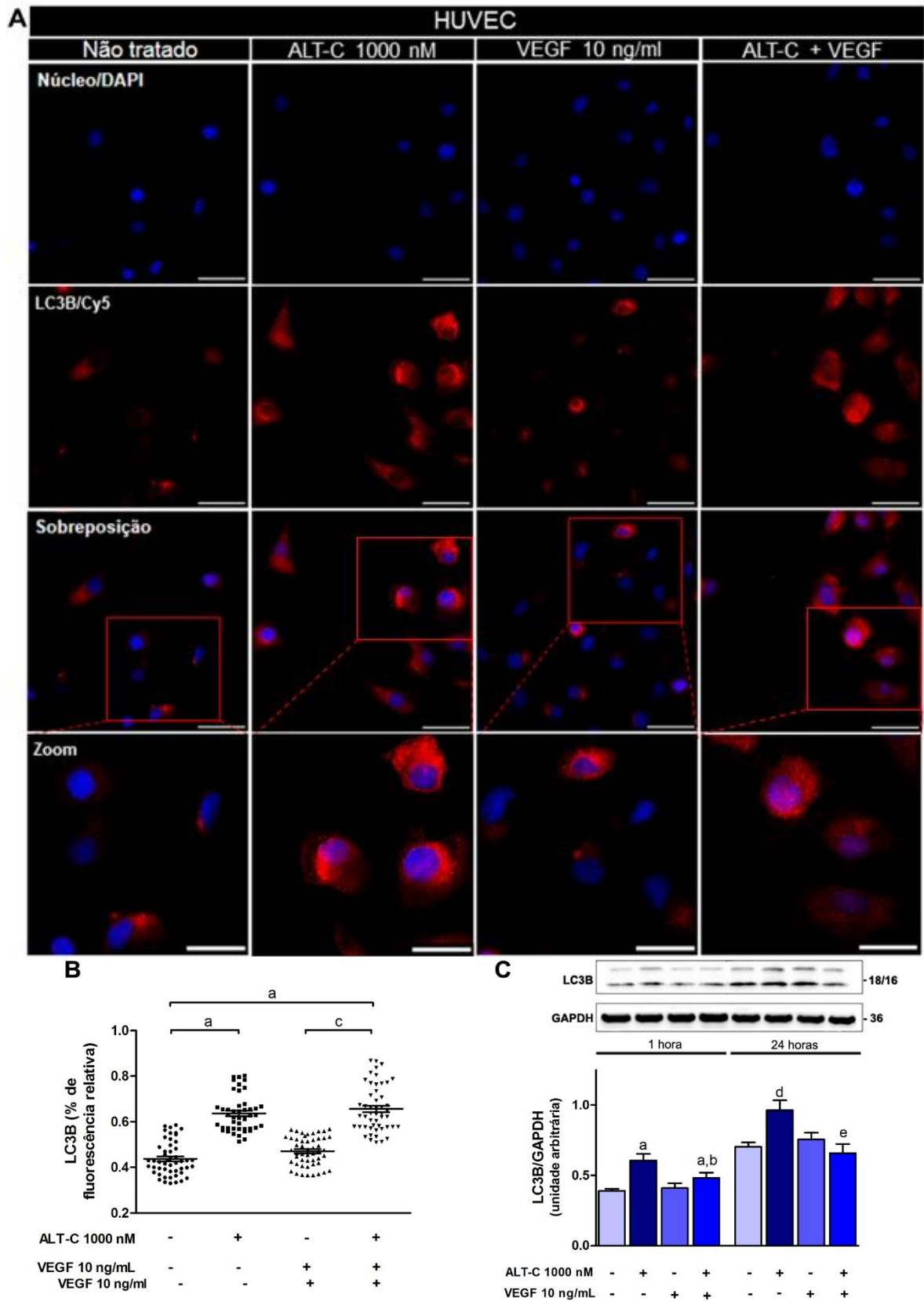
Ao inibir as vias de ERK 1/2 e PI3K em HUVECs, a ALT-C mantém uma resposta antiangiogênica mesmo na presença do VEGF, interferindo no processo angiogênico. A lectina AACT (domínio ECD) teve a mesma resposta que a ALT-C, reduzindo a sinalização de ERK e PI3K estimulada por VEGF ao inibir a integrina $\alpha_2\beta_1$ (CHUNG et al., 2017). A desintegrina DisBa-01 (1000 nM) e a desintegrina-símile acuragina-C (40 nM) também inibiram a fosforilação de ERK e PI3K induzidas por VEGF e pelo fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF-2), respectivamente, mas de maneira diferente da ALT-C, o efeito antiangiogênico dessas proteínas se deu

pelo bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ em HUVECs (WANG, 2010; DANILUCCI et al., 2019).

4.15 ALT-C AUMENTOU O CONTEÚDO PROTEICO DO MARCADOR AUTOFÁGICO LC3B

Estudos mostraram que a inibição da via de sinalização da PI3K induz autofagia, a qual, por sua vez, inibe o processo angiogênico (BUTLER et al., 2017; ZHANG et al., 2017; SCOTT et al., 2018). No presente trabalho, nós observamos que o tratamento com a ALT-C (1000 nM) por 1 hora inibiu a fosforilação de PI3K, nos levando a questionar se a desintegrina-símile também é capaz de modular a autofagia. Como visto na figura 34A-B, ALT-C (1000 nM) aumentou a intensidade de fluorescência da proteína LC3B quando comparado à HUVECs não tratadas e induzidas por VEGF (45,5% e 50%, respectivamente). Por ensaio de *Western Blotting*, nós corroboramos nossos dados de fluorescência, demonstrando que a ALTC (1000 nM) aumenta o conteúdo proteico de LC3B, induzindo autofagia nas células endoteliais nos tempos de 1 e 24 horas. Esse efeito foi atenuado em células estimuladas com VEGF (Figura 34C).

Figura 34 - ALT-C aumenta o conteúdo proteico de LC3B, induzindo autofagia em HUVECs



A, Imagens representativas da detecção imunofluorescente da proteína LC3B (aumento: 60x; barras de escala: 50 e 30 μ m). HUVECs foram tratadas com ALT-C (1000 nM), VEGF (10 ng/mL) ou ambos durante 30 minutos, seguido de incubação com anticorpo primário anti-LC3B e anticorpo secundário APC. Núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). LC3B é mostrado em vermelho (Cy5). **B**,

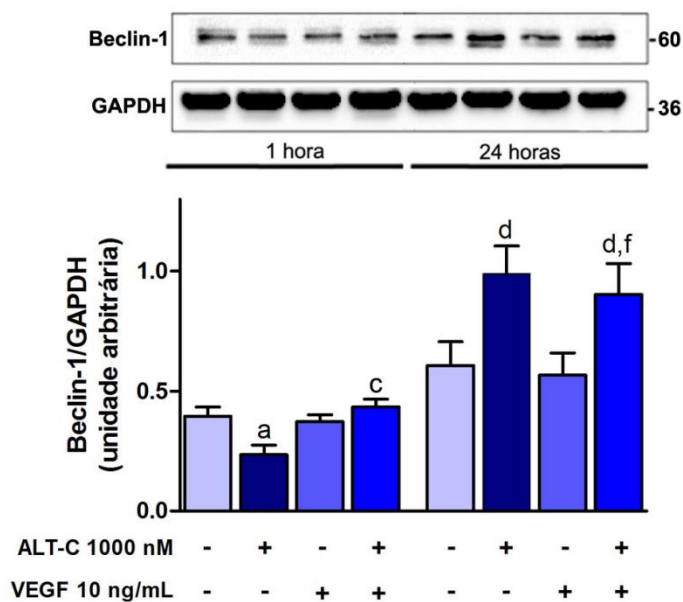
ALT-C aumentou a porcentagem de fluorescência relativa de LC3B, a qual foi calculada como intensidade média de vesículas por intensidade média de núcleos (gráfico de dispersão). Valores de $p < 0.05$ foram considerados com significância estatística: quando comparados aos grupos controle (a), ALT-C (b) e VEGF (c). Todos os dados foram obtidos de pelo menos três experimentos independentes em triplicata e representados como média \pm erro padrão da média. **C**, *Western Blotting* da proteína LC3B, após tratamento das células com ALT-C (1000 nM), VEGF (10 ng/mL) ou ambos por 1 e 24 horas. GAPDH foi utilizado como controle de carregamento. As bandas proteicas foram quantificadas por densitometria (gráfico de coluna) através do software ImageJ (versão 1.51n). Valores de $p < 0.05$ foram considerados com significância estatística: quando comparados aos grupos controle (a), ALT-C (b) e VEGF (c) para 1 hora e quando comparados aos grupos controle (d), ALT-C (e) e VEGF (f) para 24 horas. Todos os dados foram representados como média \pm erro padrão da média. Os ensaios foram repetidos pelo menos três vezes em triplicata

A autofagia é uma das principais vias de degradação intracelular que regula a homeostase e a reciclagem celular ao remover materiais citoplasmáticos e organelas danificadas das células (DU et al., 2012; YANG et al., 2014; BUTLER et al., 2017; SCHAAF et al., 2019). O LC3B, um dos homólogos pertencentes à família de cadeia leve 3 da proteína 1 associada à microtúbulos (MAP1LC3), é um dos principais marcadores de membrana autofágicos, participando do alongamento do autofagossomo, uma das etapas iniciais da autofagia (WILD; MCEWAN; DIKIC, 2014). Portanto, detectar o LC3B por Imunofluorescência e *Western Blotting* se tornou essencial para monitorar o processo autofágico (TANIDA; UENO; KOMINAMI, 2008).

A angiogênese e a autofagia são dois processos biológicos intimamente relacionados. Estudos mostraram que o aumento de autofagia induz a inibição da migração e da tubulogênese de células endoteliais, além de diminuir os níveis proteicos de VEGFR2, fatores que levam ao impedimento da angiogênese (DU et al., 2012; KUMAR et al., 2013; PAN et al., 2017). No nosso trabalho, a ALT-C reduziu a fosforilação de PI3K, redução esta que é conhecida por induzir a autofagia, com consequente diminuição do processo angiogênico (BUTLER et al., 2017; ZHANG et al., 2017; SCOTT et al., 2018). Além disso, a ALT-C aumentou o conteúdo proteico de LC3B, trabalhando como um promotor de autofagia, inibindo a angiogênese não somente pelo bloqueio da integrina $\alpha_2\beta_1$ e interferência no eixo VEGF/VEGFR2, mas também ao promover o processo autofágico nas células endoteliais. Outros compostos como a convalatoxina (10 nM), o Ery5 (10000 nM) e o MGO (25000 nM) também inibiram a cascata angiogênica em HUVECs, diminuindo o conteúdo proteico de VEGFR2 e aumentando os níveis de LC3B, ativando a autofagia nas células endoteliais (LIU et al., 2012; KUMAR et al., 2013; YANG et al., 2014).

Adicionalmente, a ALT-C (1000 nM) aumentou o conteúdo proteico do marcador autofágico beclin-1 em HUVECs tratadas com VEGF tanto em 1 quanto em 24 horas (Figura 35). A beclin-1 é uma proteína importante na iniciação do processo autofágico ao regular o recrutamento de proteínas relacionadas à autofagia (Atgs) durante a formação do autofagossomo (FUSCO et al., 2018). Este resultado ressalta a participação da desintegrina-símile na promoção de autofagia em células endoteliais mesmo na presença de um fator proangiogênico.

Figura 35 - ALT-C aumenta o conteúdo proteico de Beclin-1 na presença de VEGF, promovendo autofagia em HUVECs

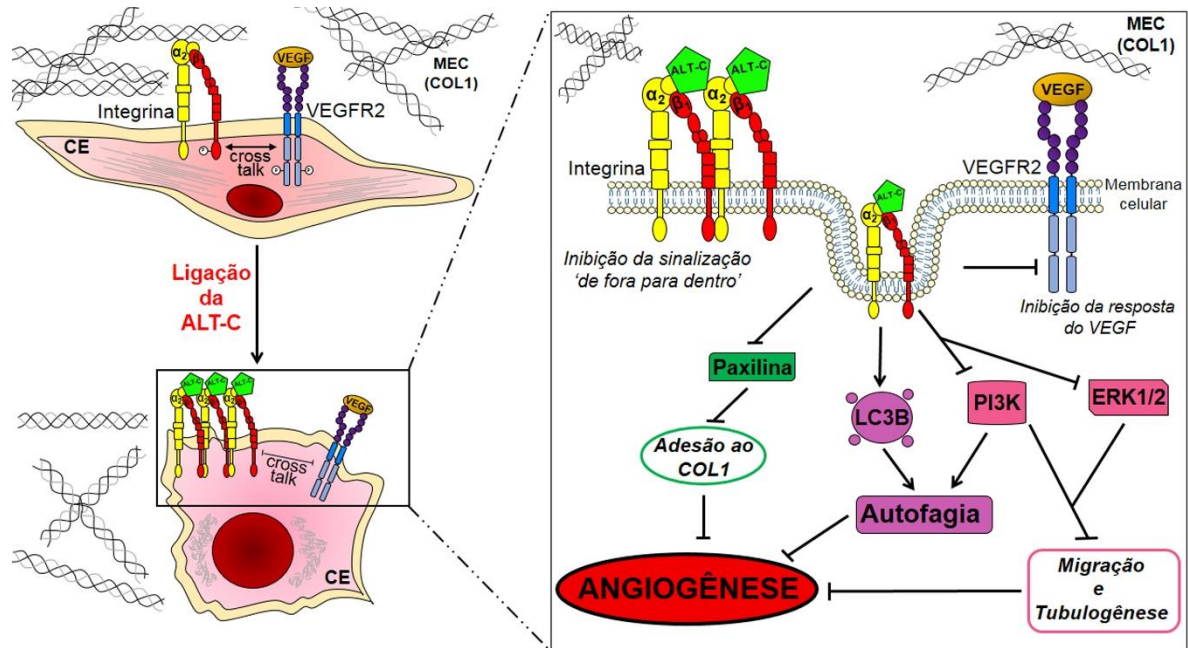


Western Blotting de Beclin-1 após tratamento das células com ALT-C (1000 nM), VEGF (10 ng/mL) ou ambos por 1 e 24 horas. GAPDH foi utilizado como controle de carregamento. As bandas proteicas foram quantificadas por densitometria (gráficos de coluna) através do software ImageJ (versão 1.51n). Valores de $p < 0.05$ foram considerados com significância estatística: quando comparados aos grupos controle (a), ALT-C (b) e VEGF (c) para 1 hora e quando comparados aos grupos controle (d), ALT-C (e) e VEGF (f) para 24 horas. Todos os dados foram representados como média \pm erro padrão da média. Os ensaios foram repetidos pelo menos três vezes em triplicata

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho forneceu informações adicionais e inéditas sobre o mecanismo de inibição da angiogênese pela ALT-C, um ligante da integrina $\alpha_2\beta_1$, a qual é um receptor importante no controle da ativação do eixo VEGF/VEGFR2. Nós demonstramos que a ALT-C se liga à integrina $\alpha_2\beta_1$ em células endoteliais (HUVEC), causando alterações morfológicas nesta linhagem celular e inibindo a sinalização 'de fora para dentro' da integrina (Figura 36). Além disso, relatamos pela primeira vez a interferência direta do tratamento da ALT-C na sinalização do eixo VEGF/VEGFR2. A inibição da integrina $\alpha_2\beta_1$ promovida pela desintegrina-símile interferiu no *crosstalk* $\alpha_2\beta_1$ /VEGFR2, inibindo diversas vias angiogênicas (ERK 1/2, PI3K e FAK-Src/paxilina), levando à desadesão parcial das células endoteliais, com decréscimo no número de filopódios e inibição dos processos de migração celular e tubulogênese (Figura 36). Adicionalmente, nós mostramos pela primeira vez que a ALT-C eleva os níveis proteicos do marcador autofágico LC3B em HUVECs, ativando a autofagia, mecanismo que possibilita que as células sobrevivam sem forte adesão ao COL1 da MEC (Figura 36). Todos os efeitos promovidos pela ALT-C resultam em inibição da angiogênese, ressaltando o caráter antiangiogênico desta desintegrina-símile.

Figura 36 – ALT-C inibe a integrina $\alpha_2\beta_1$, interferindo no *crossstalk* $\alpha_2\beta_1$ /VEGFR2, com subsequente inibição da sinalização do VEGF e diminuição da angiogênese



Há a existência de um *crossstalk* entre a integrina $\alpha_2\beta_1$ e o receptor proangiogênico VEGFR2 nas membranas das células endoteliais (HUVEC), *crossstalk* este que leva à promoção do processo angiogênico. No presente trabalho, observamos que a ligação da desintegrina-símile ALT-C à integrina $\alpha_2\beta_1$ causa alterações morfológicas na linhagem HUVEC, interferindo no *crossstalk* $\alpha_2\beta_1$ /VEGFR2, além de inibir a sinalização 'de fora para dentro' da integrina $\alpha_2\beta_1$ e a resposta do VEGF no eixo VEGF/VEGFR2. Essa interferência inibe as vias angiogênicas de ERK 1/2, PI3K e paxilina, inibindo os processos de adesão celular ao COL1, migração celular e tubulogênese. Adicionalmente, a ALT-C é capaz de ativar autofagia ao aumentar o conteúdo proteico do marcador autofágico LC3B nas células endoteliais. Todos estes efeitos culminam na inibição da angiogênese pela ALT-C

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou pela primeira vez que a desintegrina-símile ALT-C interfere no *crosstalk* $\alpha_2\beta_1$ /VEGFR2 em células endoteliais, inibindo a angiogênese. Nossos resultados indicaram que a ALT-C é uma potencial candidata no tratamento antiangiogênico em processos tumorais e metastáticos. Além disso, nós ressaltamos o papel da ALT-C na inibição de vias de sinalização associadas à integrina $\alpha_2\beta_1$, indicando a importância da desintegrina-símile como ferramenta de pesquisa em estudos básicos. Por fim, nosso trabalho validou a integrina $\alpha_2\beta_1$ como alvo terapêutico, evidenciando o papel fundamental da inibição de integrinas como terapia antiangiogênica considerando-se a resistência das células tumorais aos tratamentos antiangiogênicos atualmente disponíveis, os quais focam principalmente na inibição do VEGF por meio de anticorpos.

REFERÊNCIAS

- ACHÊ, D. C. et al. Biochemical properties of a new PI SVMP from *Bothrops pauloensis*: Inhibition of cell adhesion and angiogenesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 445–453, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.050>>.
- ADINI, A. et al. A novel strategy to enhance angiogenesis in vivo using the small VEGF-binding peptide PR1P. **Angiogenesis**, v. 20, n. 3, p. 399–408, 2017.
- ALDAY-PAREJO, B.; STUPP, R.; RÜEGG, C. Are integrins still practicable targets for anti-cancer therapy? **Cancers**, v. 11, n. 7, p. 1–30, 2019.
- ALMEIDA, M. C. et al. Leucurogin and melanoma therapy. **Toxicon**, v. 159, p. 22–31, 2019.
- AMARAVADI, R.; KIMMELMAN, A. C.; WHITE, E. Recent insights into the function of autophagy in cancer. **Genes & Development**, v. 30, n. 17, p. 1913–1930, 2016.
- ANGULO, Y. et al. Isolation and characterization of four medium-size disintegrins from the venoms of Central American viperid snakes of the genera *Atropoides*, *Bothrops*, *Cerrophidion* and *Crotalus*. **Biochimie**, v. 107, p. 376–384, 2014.
- APTE, R. S.; CHEN, D. S.; FERRARA, N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. **Cell**, v. 176, n. 6, p. 1248–1264, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021>>.
- ARJONEN, A. et al. Distinct Recycling of Active and Inactive $\beta 1$ Integrins. **Traffic**, v. 13, n. 4, p. 610–625, 2012.
- ARNAOUTOVA, I.; KLEINMAN, H. K. In vitro angiogenesis: Endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. **Nature Protocols**, v. 5, n. 4, p. 628–635, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2010.6>>.
- ÁVALOS, Y. et al. Tumor Suppression and Promotion by Autophagy. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–15, 2014.
- AVRAAMIDES, C. J.; GARMY-SUSINI, B.; VARNER, J. A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 8, p. 604–617, 2008.
- BACHMANN, M. et al. Cell adhesion by integrins. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 4, p. 1655–1699, 2019.
- BRILHA, S. et al. Integrin $\alpha 2\beta 1$ Expression Regulates Matrix Metalloproteinase-1-Dependent Bronchial Epithelial Repair in Pulmonary Tuberculosis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1–11, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.01348/full>>.
- BRIZZI, M. F.; TARONE, G.; DEFILIPPI, P. Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 24, n. 5, p. 645–651, 2012.
- BUTLER, D. E. et al. Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway activates autophagy and compensatory Ras/Raf/MEK/ERK signalling in prostate cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 34, p. 56698–56713, 2017.
- CALVETE, J. J. et al. Snake venom disintegrins: Novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. **Biochemical Journal**, v. 372, n. 3, p. 725–734, 2003.
- CAO, Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, p. 357–369, 2001.
- CARMELIET, P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. **Oncology**, v. 69, n. SUPPL. 3, p. 4–10, 2005.
- CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v. 407, p. 249–257, 2000.

- CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 298–307, 2011.
- CARPENTIER, G. et al. Angiogenesis Analyzer for ImageJ. In: 4th ImageJ User and Developer Conference proceedings, Mondorf-les-Bains, Luxembourg. **Anais...** Mondorf-les-Bains, Luxembourg: 2012. Disponível em: <isbn: 2-919941-18-6>.
- CASAL, J. I.; BARTOLOMÉ, R. A. RGD cadherins and $\alpha\beta 1$ integrin in cancer metastasis: A dangerous liaison. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1869, n. 2, p. 321–332, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.04.005>>.
- CESAR, P. H. S. et al. Snake Venom Disintegrins: An Overview of their Interaction with Integrins. **Current Drug Targets**, v. 20, n. 4, p. 465–477, 2018.
- CHAMORRO-JORGANES, A. et al. VEGF-Induced Expression of miR-17-92 Cluster in Endothelial Cells Is Mediated by ERK/ELK1 Activation and Regulates Angiogenesis. **Circulation Research**, v. 118, n. 1, p. 38–47, 2016.
- CHANDRA, A. et al. Autophagy as a mechanism for anti-angiogenic therapy resistance. **Seminars in Cancer Biology**, p. 1–14, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.semcan.2019.08.031>>.
- CHEN, H. et al. Sulfated fucoidan FP08S2 inhibits lung cancer cell growth in vivo by disrupting angiogenesis via targeting VEGFR2/VEGF and blocking VEGFR2/Erk/VEGF signaling. **Cancer Letters**, v. 382, n. 1, p. 44–52, 2016a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2016.08.020>>.
- CHEN, W.-S. et al. Pathological lymphangiogenesis is modulated by galectin-8-dependent crosstalk between podoplanin and integrin-associated VEGFR-3. **Nature Communications**, v. 7, p. 1–17, 2016b.
- CHUNG, A. S.; FERRARA, N. Developmental and Pathological Angiogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, n. 1, p. 563–584, 2011.
- CHUNG, A. S.; LEE, J.; FERRARA, N. Targeting the tumour vasculature: Insights from physiological angiogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 7, p. 505–514, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc2868>>.
- CHUNG, C. H. et al. Aggretin Venom Polypeptide as a Novel Anti-angiogenesis Agent by Targeting Integrin $\alpha 2\beta 1$. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–11, 2017.
- CLAPP, C. et al. Peptide hormone regulation of angiogenesis. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 4, p. 1177–1215, 2009.
- 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, 2004.
- CRUZ DA SILVA, E. et al. Role of Integrins in Resistance to Therapies Targeting Growth Factor Receptors in Cancer. **Cancers**, v. 11, n. 5, p. 1–27, 2019.
- CUI, S. et al. Genistein inhibits the growth and regulates the migration and invasion abilities of melanoma cells via the FAK/paxillin and MAPK pathways. **Oncotarget**, v. 8, n. 13, p. 21674–21691, 2017.
- DA CUNHA, E. M.; MARTINS, O. A. Principais Compostos Químicos Presente Nos Venenos De Cobras Dos Gêneros Bothrops E Crotalus – Uma Revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, v. 2, n. 1980, p. 21–26, 2012.
- DA SILVA, I. R. F. et al. BJ-PI2, A non-hemorrhagic metalloproteinase from Bothrops jararaca snake venom. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1820, n. 11, p. 1809–1821, 2012.
- DANILUCCI, T. M. et al. Recombinant RGD-disintegrin DisBa-01 blocks integrin $\alpha\beta 3$ and impairs VEGF signaling in endothelial cells. **Cell Communication and Signaling**, v. 1, p. 1–15, 2019.
- DE AVILA, R. A. M. et al. Mimotopes of mutalysin-II from Lachesis muta snake venom induce hemorrhage inhibitory antibodies upon vaccination of rabbits. **Peptides**, v. 32, n. 8, p.

1640–1646, 2011.

DE FRANCESCHI, N. et al. Selective integrin endocytosis is driven by interactions between the integrin α -chain and AP2. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 23, n. 2, p. 172–179, 2016.

DE LUCA, A. et al. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 16, n. sup2, p. S17–S27, 2012. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14728222.2011.639361>>.

DE LUCA, M. et al. Jararhagin and jaracetin: Novel snake venom inhibitors of the integrin collagen receptor, $\alpha 2\beta 1$. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 206, n. 2, p. 570–576, 1995.

DE MORAIS, I. C. O. et al. Bothrops leucurus venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia. **Toxicon**, v. 61, n. 1, p. 38–46, 2013.

DE PAULA, F. F. P. et al. Molecular characterization of metalloproteases from Bothrops alternatus snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics**, v. 12, p. 74–83, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbd.2014.09.001>>.

DECICCO-SKINNER, K. L. et al. Endothelial cell tube formation assay for the in vitro study of angiogenesis. **Journal of Visualized Experiments**, v. 10, n. 91, p. 1–8, 2014.

DEWANGAN, J. et al. Centchroman regulates breast cancer angiogenesis via inhibition of HIF-1 α /VEGFR2 signalling axis. **Life Sciences**, v. 193, p. 9–19, 2018.

DIKIC, I.; ELAZAR, Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 6, p. 349–364, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>>.

DONG, Y. et al. VEGF promotes cartilage angiogenesis by phospho-ERK1/2 activation of Dll4 signaling in temporomandibular joint osteoarthritis caused by chronic sleep disturbance in Wistar rats. **Oncotarget**, v. 8, n. 11, p. 17849–17861, 2017. Disponível em: <<http://www.oncotarget.com/fulltext/14874>>.

DU, J. et al. Role of autophagy in angiogenesis in aortic endothelial cells. **AJP: Cell Physiology**, v. 302, n. 2, p. C383–C391, 2012.

EHLING, M. et al. Integrin $\beta 1$ controls VE-cadherin localization and blood vessel stability. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 1–14, 2015.

EICHMANN, A.; SIMONS, M. VEGF signaling inside vascular endothelial cells and beyond. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 24, n. 2, p. 188–193, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2012.02.002>>.

FERRARA, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 10, p. 795–803, 2002.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 4, p. 581–611, 2004.

FERRARA, N. Vascular Endothelial Growth Factor. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, p. 789–791, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=19164810>.

FERRARA, N.; ADAMIS, A. P. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 6, p. 385–403, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2015.17>>.

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

FERRARA, N.; HENZEL, W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 161, n. 2, p. 851–858, 1989.

- FERRARA, N.; KERBEL, R. S. Angiogenesis as a therapeutic target. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 967–974, 2005.
- FOLKMAN, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. **Seminars in Oncology**, v. 29, n. 6, p. 15–18, 2002.
- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **The FEBS journal**, v. 275, p. 3016–3030, 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. 200–209, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.015>>.
- FRANCESCHI, N. De et al. Integrin traffic – the update. **Journal of Cell Science**, v. 128, p. 1–14, 2015.
- FU, P. et al. Role played by paxillin and paxillin tyrosine phosphorylation in hepatocyte growth factor/sphingosine-1-phosphate-mediated reactive oxygen species generation, lamellipodia formation, and endothelial barrier function. **Pulm Circ**, v. 5, n. 4, p. 619–630, 2015.
- FUNAHASHI, Y. et al. Sulfonamide derivative, E7820, is a unique angiogenesis inhibitor suppressing an expression of integrin $\alpha 2$ subunit on endothelium. **Cancer Research**, v. 62, n. 21, p. 6116–6123, 2002.
- FUSCO, C. et al. TRIM50 regulates Beclin 1 proautophagic activity. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1865, n. 6, p. 908–919, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.03.011>>.
- GERBER, H. P.; FERRARA, N. The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 81, n. 1, p. 20–31, 2003.
- GHATAK, S. et al. Role of Integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ in Wound and Tumor Angiogenesis in Mice. **The American Journal of Pathology**, v. 186, n. 11, p. 3011–3027, 2016.
- GOLUBKOV, V.; HAWES, D.; MARKLAND, F. S. Anti-angiogenic activity of contortrostatin, a disintegrin from Agkistrodon contortrix contortrix snake venom. **Angiogenesis**, v. 6, n. 3, p. 213–224, 2003.
- GRIFFIOEN, A. W.; MOLEMA, G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 2, p. 237–68, 2000.
- GUIMARÃES, D. de O. et al. In vitro antitumor and antiangiogenic effects of Bothropoidin, a metalloproteinase from Bothrops pauloensis snake venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 770–777, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.064>>.
- GULLBERG, D. et al. Analysis of $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ integrins in cell–collagen interactions: identification of conformation dependent $\alpha 1\beta 1$ binding sites in collagen type I. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 11, p. 3865–3873, 1992.
- GUTIÉRREZ, J. M. et al. A Comprehensive View of the Structural and Functional Alterations of Extracellular Matrix by Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs): Novel Perspectives on the Pathophysiology of Envenoming. **Toxins**, v. 8, n. 10, p. 1–21, 2016.
- HALL, R. D. et al. Angiogenesis inhibition as a therapeutic strategy in non-small cell lung cancer (NSCLC). **Transl Cancer Res**, v. 4, n. 5, p. 515–523, 2015.
- HAMIDI, H.; IVASKA, J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, p. 533–548, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41568-018-0038-z>>.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011.
- HASSANPOUR, M. et al. Distinct role of autophagy on angiogenesis: highlights on the effect of autophagy in endothelial lineage and progenitor cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v.

9, n. 305, p. 1–16, 2018.

HE, L. et al. The contributions of the $\alpha 2\beta 1$ integrin to vascular thrombosis in vivo. **Blood**, v. 102, n. 10, p. 3652–3657, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1323>>.

HEITZIG, N. et al. Annexin A8 promotes VEGF-A driven endothelial cell sprouting. **Cell Adhesion & Migration**, v. 6918, p. 1–13, 2017.

HERRERA, C. et al. Tissue Localization and Extracellular Matrix Degradation by PI, PII and PIII Snake Venom Metalloproteinases: Clues on the Mechanisms of Venom-Induced Hemorrhage. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. 1–20, 2015.

HODIVALA-DILKE, K. M.; REYNOLDS, A. R.; REYNOLDS, L. E. Integrins in angiogenesis: Multitalented molecules in a balancing act. **Cell and Tissue Research**, v. 314, n. 1, p. 131–144, 2003.

ISKRATSCH, T.; WOLFENSON, H.; SHEETZ, M. P. Appreciating force and shape—the rise of mechanotransduction in cell biology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 1–9, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3903>>.

JAHANGIRI, A.; AGHI, M. K.; CARBONELL, W. S. $\beta 1$ Integrin: Critical Path to Antiangiogenic Therapy Resistance and Beyond. **Cancer Research**, v. 74, n. 1, p. 3–7, 2014.

JANG, I.; BENINGO, K. A. Integrins, CAFs and mechanical forces in the progression of cancer. **Cancers**, v. 11, n. 5, p. 1–17, 2019.

JÄRVINEN, M.; YLÄNNE, J.; VIRTANEN, I. The Effect of Differentiation Inducers on the Integrin Expression of K562 Erythroleukemia Cells. **Cell Biology International**, v. 17, n. 4, p. 399–407, 1993.

JIA, L. G. et al. Inhibition of platelet aggregation by the recombinant cysteine-rich domain of the hemorrhagic snake venom metalloproteinase, atrolysin A. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 373, n. 1, p. 281–286, 2000.

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

KARDIDEH, B. et al. Autophagy, cancer and angiogenesis: where is the link? **Cell & Bioscience**, v. 9, n. 65, p. 1–10, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13578-019-0327-6>>.

KECHAGIA, J. Z.; IVASKA, J.; ROCA-CUSACHS, P. Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, p. 457–473, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41580-019-0134-2>>.

KECK, P. J. et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. **Science**, v. 246, n. 4935, p. 1309–1312, 1989.

KIEC-WILK, B. et al. The MAPK-dependent regulation of the Jagged/Notch gene expression by VEGF, bFGF or PPAR gamma mediated angiogenesis in HUVEC. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 61, n. 2, p. 217–225, 2010.

KING, S. J. et al. Nesprin-1 and nesprin-2 regulate endothelial cell shape and migration. **Cytoskeleton**, v. 71, n. 7, p. 423–434, 2014.

KRAYEM, N. et al. Anti-angiogenic effect of phospholipases A2 from Scorpio maurus venom glands on Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Toxicon**, v. 145, p. 6–14, 2018.

KUCZYNSKI, E. A. et al. Vessel co-option in cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 16, p. 469–493, 2019.

KUMAR, S. et al. Autophagy triggered by magnolol derivative negatively regulates angiogenesis. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 10, p. 1–12, 2013.

KUMAR, V. B. S. et al. Angiogenic response of endothelial cells to fibronectin. In: SUDHAKARAN, P. R.; SUROLIA, A. (Ed.). **Biochemical Roles of Eukaryotic Cell Surface Macromolecules**. [s.l.] Springer Science+Business Media, 2012. p. 131–151.

- LAFOYA, B. et al. Beyond the matrix: The many non-ECM ligands for integrins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 1–33, 2018.
- LAMALICE, L.; LE BOEUF, F.; HUOT, J. Endothelial cell migration during angiogenesis. **Circulation Research**, v. 100, n. 6, p. 782–794, 2007.
- LAZAROVICI, P.; MARCINKIEWICZ, C.; LELKES, P. I. From Snake Venom's Disintegrins and C-Type Lectins to Anti-Platelet Drugs. **Toxins**, v. 11, n. 5, p. 1–15, 2019.
- LEE, W. S. et al. TTAC-0001, a human monoclonal antibody targeting VEGFR-2/KDR, blocks tumor angiogenesis. **mAbs**, v. 7, n. 5, p. 957–968, 2015.
- LEUNG, D. W. et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science**, v. 246, n. 4935, p. 1306–1309, 1989.
- LIEKENS, S.; DE CLERCQ, E.; NEYTS, J. Angiogenesis: Regulators and clinical applications. **Biochemical Pharmacology**, v. 61, n. 3, p. 253–270, 2001.
- LIMA-DOS-SANTOS, I. et al. Characterization of Neuwiedin, a new disintegrin from Bothrops neuwiedi venom gland with distinct cysteine pattern. **Toxicon**, v. 104, p. 57–64, 2015.
- LIU, F. et al. Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 8, n. 4, p. 552–562, 2018.
- LIU, H. et al. Angiogenesis Impairment in Diabetes: Role of Methylglyoxal-Induced Receptor for Advanced Glycation Endproducts, Autophagy and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.
- LIU, J. et al. Autophagy, a double-edged sword in anti-angiogenesis therapy. **Medical Oncology**, v. 33, n. 1, p. 1–13, 2016.
- LU, X. et al. Snake Venom Metalloproteinase Containing a Disintegrin-like Domain, its Structure-activity Relationships at Interacting with Integrins. **Current Medicinal Chemistry-Cardiovascular & Hematological Agents**, v. 3, n. 3, p. 249–260, 2005.
- LUCIO-ETEROVIC, A. K.; PIAO, Y.; DE GROOT, J. F. Mediators of glioblastoma resistance and invasion during antivascular endothelial growth factor therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 14, p. 4589–4599, 2009.
- LYTTLE, D. J. et al. Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the Poxvirus Orf virus. **Journal of Virology**, v. 68, n. 1, p. 84–92, 1994.
- MACÊDO, J. K. A.; FOX, J. W.; CASTRO, M. de S. Disintegrins from snake venoms and their applications in cancer research and therapy. **Current Protein and Peptide Science**, v. 16, n. 6, p. 532–548, 2015.
- MAHABELESWAR, G. H. et al. Mechanisms of integrin-vascular endothelial growth factor receptor cross-activation in angiogenesis. **Circulation Research**, v. 101, n. 6, p. 570–580, 2007.
- 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, 2003.
- MARKLAND, F. S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 3–18, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.004>>.
- MESQUITA-FERRARI, R. A. et al. ALT-C, a disintegrin-like cys-rich protein from Bothrops alternatus, increases skeletal myoblast viability. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.**, v. 15, n. 2, p. 325–339, 2009.
- METTOUCHI, A.; MENEGUZZI, G. Distinct roles of $\beta 1$ integrins during angiogenesis. **European Journal of Cell Biology**, v. 85, p. 243–247, 2006.
- MICOCCI, K. C. et al. ADAM9 silencing inhibits breast tumor cells transmigration through blood and lymphatic endothelial cells. **Biochimie**, v. 128–129, p. 174–182, 2016.
- MINEA, R. O. et al. Vicrostatin - An anti-invasive multi-integrin targeting chimeric disintegrin with tumor anti-angiogenic and pro-apoptotic activities. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, p. 1–20, 2010.
- MOMIC, T. et al. Vimocin and Vidapin, cyclic KTS peptides, dual antagonists of $\alpha 1\beta 1/\alpha 2\beta 1$

integrins with antiangiogenic activity. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 350, p. 1–14, 2014.

MONTEIRO, D. A. et al. Alternagin-C (ALT-C), a disintegrin-like protein from *Rhinocerophis alternatus* snake venom promotes positive inotropism and chronotropism in fish heart. **Toxicon**, v. 110, p. 1–11, 2016.

MONTEIRO, D. A. et al. Alternagin-C (ALT-C), a disintegrin-like cys-rich protein isolated from the venom of the snake *Rhinocerophis alternatus*, stimulates angiogenesis and antioxidant defenses in the liver of freshwater fish, *Hoplias malabaricus*. **Toxins**, v. 9, p. 1–13, 2017.

MONTEIRO, D. A. et al. Cardioprotective effects of alternagin-C (ALT-C), a disintegrin-like protein from *Rhinocerophis alternatus* snake venom, on hypoxia-reoxygenation-induced injury in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 215, p. 67–75, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.10.003>>.

MONTENEGRO, C. F. et al. Blocking $\alpha\beta 3$ integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. **Biochimie**, v. 94, n. 8, p. 1812–1820, 2012.

MORITZ, M. N. O. et al. Alternagin-C binding to $\alpha 2\beta 1$ integrin controls matrix metalloprotease-9 and matrix metalloprotease-2 in breast tumor cells and endothelial cells. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, p. 1–12, 2018.

MOURA-DA-SILVA, A.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of Snake Venom Metalloproteinases in Cell Biology: Effects on Platelets, Inflammatory and Endothelial Cells. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 28, p. 2893–2905, 2007.

MOURA-DA-SILVA, A. M. et al. Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. **Biochimie**, v. 90, n. 3, p. 484–492, 2008.

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**, v. 52, n. 7, p. 807–816, 2008.

MUÑOZ-CHÁPULI, R.; QUESADA, A. R.; MEDINA, M. Á. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 17, p. 2224–2243, 2004.

NAGY, J. A.; DVORAK, A. M.; DVORAK, H. F. VEGF-A and the Induction of Pathological Angiogenesis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 2, n. 1, p. 251–275, 2007. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pathol.2.010506.134925>>.

NOGUEIRA JÚNIOR, F. A. et al. *Bothrops alternatus* snake venom induces cytokine expression and oxidative stress on renal function. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 1–11, 2019.

OGAWA, S. et al. A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 47, p. 31273–31282, 1998.

OHLER, M. et al. The Venomics of *Bothrops alternatus* is a Pool of Acidic Proteins with Predominant Hemorrhagic and Coagulopathic Activities research articles. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 2422–2437, 2010.

OKLU, R. et al. Angiogenesis and current antiangiogenic strategies for the treatment of cancer. **Journal of Vascular and Interventional Radiology**, v. 21, n. 12, p. 1791–1805, 2010.

OLIVEIRA, I. S. De et al. Cell migration inhibition activity of a non-RGD disintegrin from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, n. 28, p. 1–10, 2018.

PAN, C. C. et al. Angiostatic actions of capsicodendrin through selective inhibition of

- VEGFR2-mediated AKT signaling and dysregulated autophagy. **Oncotarget**, v. 8, n. 8, p. 12675–12685, 2017.
- PAPETTI, M.; HERMAN, I. M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 282, n. 5, p. C947–C970, 2002.
- PARZYCH, K. R.; KLIONSKY, D. J. An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 3, p. 460–473, 2014.
- PEACH, C. J. et al. Molecular pharmacology of VEGF-A isoforms: Binding and signalling at VEGFR2. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 1–27, 2018.
- PEDROSA, A.-R. et al. Tumor Angiogenesis Is Differentially Regulated by Phosphorylation of Endothelial Cell Focal Adhesion Kinase Tyrosines-397 and -861. **Cancer Res**, v. 79, n. 20, p. 4371–4386, 2019.
- PELÁEZ, R. et al. Integrins: Moonlighting proteins in invadosome formation. **Cancers**, v. 11, n. 5, p. 1–30, 2019.
- PHNG, L.-K.; STANCHI, F.; GERHARDT, H. Filopodia are dispensable for endothelial tip cell guidance. **Development**, v. 140, n. 19, p. 4031–4040, 2013.
- POTENTE, M.; CARMELIET, P. The Link Between Angiogenesis and Endothelial Metabolism. **Annual Review of Physiology**, v. 79, n. 1, p. 43–66, 2017.
- QU, X. et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1809–1820, 2003.
- RABELO, L. F. G. et al. Alternagin-C, a disintegrin-like protein from *Bothrops alternatus* venom, attenuates inflammation and angiogenesis and stimulates collagen deposition of sponge-induced fibrovascular tissue in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 653–660, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.171>>.
- RAMJIWAN, R. R.; GRIFFIOEN, A. W.; DUDA, D. G. Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy? **Angiogenesis**, v. 20, n. 2, p. 185–204, 2017.
- RAMOS, O. H. P. et al. 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, 2007.
- RIBATTI, D. History of Research on Angiogenesis. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 99, p. 1–14, 2014.
- ROHLENOVA, K. et al. Endothelial Cell Metabolism in Health and Disease. **Trends in Cell Biology**, v. 28, n. 3, p. 224–236, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2017.10.010>>.
- RONCA, R. et al. Tumor angiogenesis revisited: Regulators and clinical implications. **Medicinal Research Reviews**, v. 37, n. 6, p. 1231–1274, 2017.
- ROSE, H. S.; GOLAN, D. E. Farmacodinâmica. In: GOLAN, D. E. (Ed.). **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. [s.l.] Guanabara Koogan, 2009. p. 18–27.
- RUBTSOV, M. A. et al. Tetrameric RGD induces clustering of integrin $\alpha v \beta 3$ on the melanoma cell surface and decreases cell viability. **Moscow University Chemistry Bulletin**, v. 71, n. 4, p. 227–235, 2016.
- SABHERWAL, Y. et al. Integrin $\alpha 2 \beta 1$ mediates the anti-angiogenic and anti-tumor activities of angiocidin, a novel tumor-associated protein. **Experimental Cell Research**, v. 312, n. 13, p. 2443–2453, 2006.
- SANCHEZ, E. F. et al. Resolution of isoforms of mutalysin II, the metalloproteinase from bushmaster snake venom. **Toxicon**, v. 41, n. 8, p. 1021–1031, 2003.
- SANT'ANA, E. M. C. et al. Angiogenesis and growth factor modulation induced by alternagin C, a snake venom disintegrin-like, cysteine-rich protein on a rat skin wound model. **Archives**

of **Biochemistry and Biophysics**, v. 479, n. 1, p. 20–27, 2008.

SANT'ANA, E. M. C. et al. Rat skin wound healing induced by alternagin-C, a disintegrin-like, Cys-rich protein from *Bothrops alternatus* venom. **International Wound Journal**, v. 8, n. 3, p. 245–252, 2011.

SCHAAF, M. B. et al. Autophagy in endothelial cells and tumor angiogenesis. **Cell Death & Differentiation**, v. 26, p. 665–679, 2019.

SCHNITTERT, J. et al. Integrins in wound healing, fibrosis and tumor stroma: High potential targets for therapeutics and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 129, p. 37–53, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.01.020>>.

SCOTT, A. J. et al. Cabozantinib exhibits potent antitumor activity in colorectal cancer patient-derived tumor xenograft models via autophagy and signaling mechanisms. **Molecular Cancer Therapeutics**, n. 520, p. 1–38, 2018.

SEAMAN, S. et al. Genes that Distinguish Physiological and Pathological Angiogenesis. **Cancer Cell**, v. 11, n. 6, p. 539–554, 2007.

SEGUIN, L. et al. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. **Trends in Cell Biology**, p. 1–7, 2014.

SELISTRE-DE-ARAUJO, 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**, v. 38, n. 10, p. 1505–1511, 2005.

SENGER, D. et al. The $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ Integrins Provide Critical Support for Vascular Endothelial Growth Factor Signaling, Endothelial Cell Migration, and Tumor Angiogenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 160, n. 1, p. 195–204, 2002.

SENGER, D. R. et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science**, v. 219, n. 4587, p. 983–985, 1983.

SENGER, D. R. et al. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 25, p. 13612–13617, 1997.

SHIMIZU-MOTOHASHI, Y.; ASAKURA, A. Angiogenesis as a novel therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy through decreased ischemia and increased satellite cells. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 1–7, 2014.

SHORT, S. M.; TALBOTT, G. A.; JULIANO, R. L. Cell adhesion-mediated signaling events in human endothelial cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 9, n. 5, p. 1969–1980, 1998.

SILVA, R. et al. Integrins: The keys to unlocking angiogenesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 10, p. 1703–1713, 2008.

SIMON, T.; GAGLIANO, T.; GIAMAS, G. Direct Effects of Anti-Angiogenic Therapies on Tumor Cells: VEGF Signaling. **Trends in Molecular Medicine**, v. 23, n. 3, p. 282–292, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2017.01.002>>.

SIMONS, M.; GORDON, E.; CLAEISSON-WELSH, L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 10, p. 611–625, 2016.

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

SOMANATH, P. R.; MALININ, N. L.; BYZOVA, T. V. Cooperation between integrin $\alpha \beta 3$ and VEGFR2 in angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 12, n. 2, p. 177–185, 2009.

SORRELLE, N.; BREKKEN, R. KDR (kinase insert domain receptor)/ Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2. **Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology**, v. 20, n. 7, p. 392–402, 2016.

SOUZA, D. H. F. et al. The Disintegrin-like Domain of the Snake Venom Metalloprotease

- Alternagin Inhibits $\alpha 2\beta 1$ Integrin-Mediated Cell Adhesion. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 384, n. 2, p. 341–350, 2000.
- STERI, V. et al. Acute depletion of endothelial $\beta 3$ -integrin transiently inhibits tumor growth and angiogenesis in mice. **Circulation Research**, v. 114, n. 1, p. 79–91, 2014.
- STETLER-STEVENSON, W. G. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: A moving target for therapeutic intervention. **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 9, p. 1237–1241, 1999.
- SULZMAIER, F. J.; JEAN, C.; SCHLAEPFER, D. D. FAK in cancer: Mechanistic findings and clinical applications. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 9, p. 598–610, 2014.
- SUN, S.; WU, H. J.; GUAN, J. L. Nuclear FAK and its kinase activity regulate VEGFR2 transcription in angiogenesis of adult mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.
- SUNG, S. J. et al. Autophagy Is a Potential Target for Enhancing the Anti-Angiogenic Effect of Mebendazole in Endothelial Cells. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 27, n. 1, p. 117–125, 2019.
- SWENSON, S. et al. Contortrostatin, a snake venom disintegrin with anti-angiogenic and anti-tumor activity. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 34, p. 169–176, 2005.
- TABATABAI, G. The Role of Integrins in Angiogenesis. **Biochemical Basis and Therapeutic Implications of Angiogenesis**, p. 23–36, 2013.
- TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1824, p. 164–176, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.04.009>>.
- TANG, N. et al. Gamabufotalin, a major derivative of bufadienolide, inhibits VEGF-induced angiogenesis by suppressing VEGFR-2 signaling pathway. **Oncotarget**, v. 7, n. 3, p. 3533–3547, 2016.
- TANIDA, I.; UENO, T.; KOMINAMI, E. LC3 and autophagy. **Methods in Molecular Biology**, v. 445, n. 2, p. 77–88, 2008.
- TANJONI, I. et al. Snake venom metalloproteinases: Structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 42, n. 7, p. 801–808, 2003.
- TANJONI, I. et al. Different regions of the class P-III snake venom metalloproteinase jarrahagin are involved in binding to $\alpha 2\beta 1$ integrin and collagen. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1093–1099, 2010.
- TAVOR, B. et al. Endothelial FAK is required for tumour angiogenesis. **EMBO Mol Med**, v. 2, p. 516–528, 2010.
- TERRA, R. M. S. et al. Proteomic profiling of snake venom metalloproteinases (SVMPs): Insights into venom induced pathology. **Toxicon**, v. 54, n. 6, p. 836–844, 2009.
- THIELTGES, K. M. et al. Characterization of a drug-targetable allosteric site regulating vascular endothelial growth factor signaling. **Angiogenesis**, v. 21, n. 3, p. 533–543, 2018.
- TOIVANEN, P. I. et al. Snake venom VEGF Vammin induces a highly efficient angiogenic response in skeletal muscle via VEGFR-2/NRP specific signaling. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.
- TONG, Q. et al. Deltonin inhibits angiogenesis by regulating VEGFR2 and subsequent signaling pathways in endothelial cells. **Steroids**, v. 96, p. 30–36, 2015.
- TOUTOUNCHIAN, J. J. et al. Novel Small Molecule JP-153 Targets the Src-FAK-Paxillin Signaling Complex to Inhibit VEGF-Induced Retinal Angiogenesis. **Molecular Pharmacology**, v. 91, n. 1, p. 1–13, 2016.
- TRIKHA, M. et al. Purification and characterization of platelet aggregation inhibitors from snake venoms. **Thrombosis Research**, v. 73, n. 1, p. 39–52, 1994.
- TUNG, J. J.; TATTERSALL, I. W.; KITAJEWSKI, J. Tips, Stalks, Tubes: Notch-Mediated Cell

- Fate Determination and Mechanisms of Tubulogenesis during Angiogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 2, p. 1–15, 2011.
- TURNER, K. et al. Crucial Role for Endothelial Cell $\alpha 2\beta 1$ Integrin Receptor Clustering in Collagen Induced Angiogenesis. **The Anatomical Record**, p. 1–15, 2019.
- VAN BUUL, J. D.; GEERTS, D.; HUVENEERS, S. Rho GAPs and GEFs: Controlling switches in endothelial cell adhesion. **Cell Adhesion and Migration**, v. 8, n. 2, p. 108–124, 2014.
- WALSH, E. M. et al. Importance of interaction between nerve growth factor and $\alpha 9\beta 1$ integrin in glial tumor angiogenesis. **Neuro-Oncology**, v. 14, n. 7, p. 890–901, 2012.
- WANG, W.-J. Acurhagin-C, an ECD disintegrin, inhibits integrin $\alpha \nu \beta 3$ -mediated human endothelial cell functions by inducing apoptosis via caspase-3 activation. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 6, p. 1338–1351, 2010.
- WANG, Z. et al. Sulfated polysaccharide JCS1S2 inhibits angiogenesis via targeting VEGFR2/VEGF and blocking VEGFR2/Erk/VEGF signaling. **Carbohydrate Polymers**, p. 1–25, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.091>>.
- WILD, P.; MCEWAN, D. G.; DIKIC, I. The LC3 interactome at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 127, n. 1, p. 3–9, 2014.
- WOLFENSON, H.; YANG, B.; SHEETZ, M. P. Steps in Mechanotransduction Pathways that Control Cell Morphology. **Annual Review of Physiology**, v. 81, n. 1, p. 1–21, 2018.
- XUE, F.; JANZEN, D. M.; KNECHT, D. A. Contribution of filopodia to cell migration: A mechanical link between protrusion and contraction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 1–13, 2010.
- YANG, R.-S. et al. Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin. **Toxicon**, v. 45, n. 5, p. 661–669, 2005.
- YANG, S. Y. et al. Convallatoxin, a dual inducer of autophagy and apoptosis, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–9, 2014.
- YEH, C.; PENG, H.-C.; HUANG, T.-F. Accutin, a new disintegrin, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo by acting as integrin $\alpha \nu \beta 3$ antagonist and inducing apoptosis. **Blood**, v. 92, p. 3268–3276, 1 dez. 1998.
- ZAKRAOUI, O. et al. Lebein, a snake venom disintegrin, suppresses human colon cancer cells proliferation and tumor-induced angiogenesis through cell cycle arrest, apoptosis induction and inhibition of VEGF expression. **Molecular Carcinogenesis**, v. 56, n. 1, p. 18–35, 2017.
- ZHANG, J. et al. PI3K/Akt signaling in osteosarcoma. **Clinica Chimica Acta**, v. 444, p. 182–192, 2015.
- ZHANG, J. et al. The novel VEGF receptor 2 inhibitor YLL545 inhibits angiogenesis and growth in breast cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 27, p. 41067–41080, 2016.
- ZHANG, Y. et al. Tetrahydrocurcumin induces mesenchymal-epithelial transition and suppresses angiogenesis by targeting HIF-1 α and autophagy in human osteosarcoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 53, p. 91134–91149, 2017.
- ZHAO, Q.; LI, Z. Angiogenesis. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–2, 2015.
- ZHOU, Q.; DANGELMAIER, C.; SMITH, J. B. The hemorrhagin catrocollastatin inhibits collagen-induced platelet aggregation by binding to collagen via its disintegrin-like domain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 219, n. 3, p. 720–726, 1996.
- ZHUANG, G.; FERRARA, N. The VEGF Receptor Family. In: WHEELER, D. L.; YARDER, Y. (Ed.). **Receptor Tyrosine Kinases: Family and Subfamilies**. [s.l.] Springer International Publishing Switzerland, 2015. p. 821–841.
- ZUAZO-GAZTELU, I.; CASANOVAS, O. Molecular Mechanisms of Tumor Angiogenesis. In: MARMÉ, D. (Ed.). **Mechanisms of Tumor Angiogenesis**. Heidelberg: Springer Nature Switzerland, 2019. p. 3–31.

ANEXO A - Artigos Publicados

Artigo publicado referente ao projeto desenvolvido durante o Doutorado: SANTOS, P. K.; ALTEI, W. F.; DANILUCCI, T. M.; LINO, R. L. B.; PACHANE, B. C.; NUNES, A. C. C.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. *Alternagin-C (ALT-C), a disintegrin-like protein, attenuates $\alpha 2\beta 1$ integrin and VEGF receptor 2 signaling resulting in angiogenesis inhibition.* **Biochimie**, v. 174, p. 144-158, 2020. **Qualis: A2.**

Durante o período do Doutorado, a aluna Patty Karina dos Santos também participou da coautoria de seis artigos científicos, os quais estão listados abaixo:

1. DANILUCCI, T. M.; **SANTOS, P. K.**; PACHANE, B. C.; PISANI, G. F. D.; LINO, R. L. B.; CASALI, B. C.; ALTEI, W. F.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. *Recombinant RGD-disintegrin DisBa-01 blocks integrin $\alpha v\beta 3$ and impairs VEGF signaling in endothelial cells.* **Cell Communication and Signaling**, 2019. **Qualis: A2**
2. FERREIRA, B. A.; RABELO, L. F. G.; DECONTE, S. R.; TOMIOSSO, T.; **SANTOS, P. K.**; ANDRADE, S.; ARAUJO, H. S. S.; ARAUJO, F. A. *Alternagin-C, a disintegrin-like protein from *Bothrops alternatus* venom, attenuates inflammation and angiogenesis and stimulates collagen deposition of sponge-induced fibrovascular tissue in mice.* **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019. **Qualis: A1**
3. LINO, R. L. B.; **DOS SANTOS, P. K.**; PISANI, G. F. D.; ALTEI, W. F.; COMINETTI, M. R.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. *Alphavbeta3 integrin blocking inhibits apoptosis and induces autophagy in murine breast tumor cells.* **Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research**, 2019. **Qualis: A2**
4. VAN DE VELDE, A. C.; GAY, C. C.; DE OLIVERA MORITZ, M. N.; **DOS SANTOS, P. K.**; BUSTILLO, S.; RODRÍGUEZ, J. P.; ACOSTA, O. C.; BISCOGLIO, M. J.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; LEIVA, L. C. *Purification of a fragment obtained by autolysis of a PIIIb-SVMP from *Bothrops alternatus* venom.* **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018. **Qualis: A1**
5. MORITZ, M. N. O.; EUSTÁQUIO, L. M. S.; MICOCCI, K. C.; NUNES, A. C. C.; **DOS SANTOS, P. K.**; DE CASTRO VIEIRA, T.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. *Alternagin-C binding to $\alpha 2\beta 1$ integrin controls matrix metalloprotease-9 and matrix metalloprotease-2 in breast tumor cells and endothelial cells.* **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, 2018. **Qualis: A3**
6. MONTENEGRO, C. F.; CASALI, B. C.; LINO, R. L. B.; PACHANE, B. C.; **SANTOS, P. K.**; HORWITZ, A. R.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; LAMERS, M. L. *Inhibition of $\alpha v\beta 3$ integrin induces loss of cell directionality of oral squamous carcinoma cells (OSCC).* **PLoS One**, 2017. **Qualis: A1**