

Rafaela Silva Mendonça

O PAPEL DA INSULARINA, UMA DISINTEGRINA RECOMBINANTE (GST-INS), EM PROCESSOS DE PROGRESSÃO TUMORAL: ESTUDOS *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO
2016

Rafaela Silva Mendonça

O PAPEL DA INSULARINA, UMA DISINTEGRINA RECOMBINANTE (GST-INS), EM PROCESSOS DE PROGRESSÃO TUMORAL: ESTUDOS *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Maisa Splendore Della Casa

Versão original

SÃO PAULO
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Mendonça, Rafaela Silva.

O papel da insularina, uma disintegrina recombinante (GST-INS), em processos de progressão tumoral: estudos *in vitro* / Rafaela Silva Mendonça. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Maisa Splendore Della Casa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Eventos de adesão na progressão tumoral.

Versão do título para o inglês: The role of insularin, a recombinant disintegrin (GST-INS) in tumor progression processes: *in vitro* studies.

1. Integrina 2. Plaqueta 3. Melanoma 4. Células endoteliais 5. Adesão celular 6. Disintegrinas I. Casa, Profa. Dra. Maisa Splendore Della II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB040/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rafaela Silva Mendonça.

Título da Dissertação: O papel da insularina, uma disintegrina recombinante (GST-INS), em processos de progressão tumoral: estudos *in vitro*.

Orientador(a): Profa. Dra. Maisa Splendore Della Casa.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 24 de junho de 2015.

PARECER 1251/CEPSH

CAAE: 46237615.0.0000.5467

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Efeito da insularina como antagonista de integrinas α IIb β 3 e α v β 3 e na inibição do crescimento tumoral*" da pesquisadora Profa. Dra. **Maisa Splendore Della Casa** e aluna **Rafaela Silva Mendonça**

Cabe aos pesquisadores elaborar e apresentar a este Comitê relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: **icb.usp.br**.

Aos pesquisadores cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **24.06.2016**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M. A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

A Deus que se faz presente em todos os dias da minha vida, iluminando meus passos e realizando meus maiores sonhos.

Aos meus pais Edilson e Luzia, com todo meu amor e gratidão pelos anos de dedicação à minha formação acadêmica. Dedico minhas maiores conquistas a vocês que muitas vezes trabalharam dobrado, sacrificando seus sonhos em favor dos meus. Este momento só existe porque vocês se doaram e aceitaram viver este sonho comigo. Obrigada pelo amor, pela educação e alegria de chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho.

Em especial à minha orientadora Dra. Maisa Splendore Della Casa pelo incentivo e confiança mais uma vez depositada. Maisa pra mim você é a tradução de ética, competência inesgotável e profissionalismo. Teus ensinamentos tem me dirigido pela vida profissional e tem me dado às asas que preciso para voar. Muito obrigada!

Ao meu noivo Alexsandro pelo companheirismo, paciência e pelas palavras que por muitas vezes me tranquilizaram e acalmaram meu coração. Muito obrigada pelo seu amor e cuidado!

Às minhas irmãs Gabriela e Isabela por todo amor e carinho. Minhas palavras não são o suficiente para expressar a gratidão e o amor que sinto por vocês. Obrigada por tudo!

À aluna de Iniciação Científica, Lilian, muito obrigada pelo companheirismo na bancada, pelas discussões em grupo e pela padronização dos ensaios de TCIPA.

À minha amiga querida Amanda por me auxiliar na estatística dos resultados que constam neste trabalho, e pela amizade que vai muito além da bancada. Obrigada por ser tão especial e atenciosa comigo!

À minha amiga amada Leijiane, por estar ao meu lado nestes anos, sempre me incentivando e me apoiando. Obrigada por tudo, por me auxiliar no processamento do sangue, pelas conversas científicas (sempre construtivas!) e acima de tudo pela sua amizade!

Às minhas amigas Juçara, Cleusa e Simone, pela amizade, companheirismo e incentivo. Vocês são especiais, obrigada por estarem sempre do meu lado!

À Cris Caporrino, Lhiri Hanna e Daniele por me auxiliarem na Biologia Molecular e Eletroforese.

Aos demais colegas do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, muito obrigada pelo apoio e companheirismo em todos estes anos.

Aos membros da banca de qualificação: Dra. Ana Paula Lepique, Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni e Dra. Sylvia Stuchi Maria-Engler, pelas valiosas críticas e sugestões.

Ao Dr. Durvanei Maria do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, pela sua contribuição fornecendo-me a linhagem de células SK-MEL-28.

À Dra. Ruth Vassão e a aluna Vanessa Mendes do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, meus agradecimentos por colaborar com o desenvolvimento desse trabalho, me fornecendo a linhagem de células L929.

À Dra. Cecília Abe do Laboratório de Biologia Celular, por me fornecer gentilmente a linhagem de HeLa.

À Dra. Sandra Coccuzzo do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, por me auxiliar nos ensaios de Microscopia Confocal, sempre com boa vontade e alegria. Também pela sua contribuição teórico-científica e pelas discussões tão importantes no desenvolvimento desse trabalho.

À Dra. Patrícia Bianca Clissa do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, muito obrigada pela colaboração, pela grande disponibilidade, auxílio e discussão dos resultados.

Ao Dr. Geraldo Magalhães do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, pela disponibilidade de muitos reagentes e materiais, além dos momentos de discussões e dicas construtivas que colaboraram com esse trabalho.

À diretora do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, Dra. Eliana Faquim, pelo carinho, incentivo e apoio durante meu mestrado.

À Dra. Ana Moura pelas importantes críticas do material de qualificação.

À Dra Irene Fernandes e a Dra Kátia Barbaro pelo carinho e convívio no laboratório.

Aos técnicos, auxiliares e demais funcionários do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, obrigada pela colaboração na rotina de trabalho.

Ao Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, em especial à Beatriz, meus agradecimentos pela rica contribuição auxiliando-me na obtenção das imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, em especial ao Henrique, meus agradecimentos pelas imagens obtidas por Microscopia Confocal.

Ao Hospital Vital Brazil- IBu, em especial ao Oséias e demais funcionários, muito obrigada pela colaboração e disponibilidade com a coleta do sangue.

Ao Departamento de Imunologia/ICB-USP pelas oportunidades. Em especial a Eni, pelo seu carinho, importante apoio e disponibilidade.

Ao Instituto Butantan por ter me aberto às portas.

A CAPES pelo consentimento da Bolsa de Mestrado.

A FAPESP pelo auxílio financeiro.

Muito Obrigada!

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.
(Paulo Baleki)

RESUMO

SILVA-MENDONÇA, R. **O papel da insularina, uma disintegrina recombinante (GST-INS), em processos de progressão tumoral: estudos *in vitro***. 2016. 110 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

As metástases tumorais resultam de uma complexa cascata molecular que envolve uma série de interações adesivas e processos invasivos. Integrinas estão envolvidas na sobrevivência, proliferação, invasão (mecanismos importantes da metástase) e angiogênese tumoral. A expressão aberrante da integrina $\alpha_v\beta_3$ aparece em vários tipos de câncer incluindo melanoma metastático humano. Dentro do contexto metastático, plaquetas ligam-se a certas células tumorais e, estudos demonstram que essas células utilizam a integrina $\alpha_v\beta_3$ para ligar-se à integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ de plaquetas, em uma reação cruzada com proteínas do plasma. A integrina $\alpha_v\beta_3$ também é intensamente estimulada nos processos de angiogênese tumoral. A Insularina (GST-INS) é uma disintegrina recombinante do veneno da *Bothrops insularis* capaz de inibir a agregação plaquetária via ADP bem como a adesão de células endoteliais ao fibrinogênio. De posse dessas informações, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade da GST-INS na inibição da angiogênese; na adesão de células endoteliais (HUVECs) e de melanoma humano (SK-MEL-28) às plaquetas e na invasão de células tumorais, através de ensaios *in vitro*. A viabilidade celular da linhagem utilizada como controle L929 (fibroblasto murino) não foi comprometida através do tratamento com GST-INS em diferentes concentrações e tempos de incubação. Nos ensaios de adesão, em condições estáticas, GST-INS foi capaz de inibir totalmente a adesão de células HUVECs e SK-MEL-28 às plaquetas em comparação ao controle e ao Aggrastat® (inibidor seletivo da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$). Além de inibir a TCIPA (agregação plaquetária induzida por células tumorais) a GST-INS também inibiu a invasão de SK-MEL-28 em substrato de matrigel. Por fim, células t.End.1 (endotélio murino) ou SK-MEL-28 pré-incubadas com essa disintegrina em baixas doses não foram capazes de formar túbulos no substrato de matrigel. Resultados preliminares obtidos através de microscopia confocal demonstraram que a GST-INS liga-se a integrina α_v presente nas células SK-MEL-28. O papel da GST-INS na inibição da adesão celular, na inibição da TCIPA e na inibição da formação de túbulos por células endoteliais ou tumorais sugerem que essa disintegrina pode ser utilizada como potencial ferramenta no estudo e desenvolvimento de antagonistas que atuem como antiangiogênicos e antimetastáticos.

Palavras-chave: Integrinas. Plaqueta. Melanoma. Células endoteliais. Adesão celular. Disintegrina.

ABSTRACT

SILVA-MENDONÇA, R. **The role of insularin, a recombinant disintegrin (GST-INS) in tumor progression processes: in vitro studies.** 2016. 110 p. Masters thesis (Immunology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Tumor metastases result from a complex molecular cascade involves a series of adhesive interactions and invasive procedures. Integrins are involved in survival, proliferation, invasion (important mechanisms of metastasis) and tumor angiogenesis. Aberrant expression of integrin $\alpha v \beta 3$ appears in several types of human cancer including metastatic melanoma. Within the metastatic setting, platelets bind to certain tumor cells and studies show that these cells utilize $\alpha v \beta 3$ integrin to bind to the integrin $\alpha IIb \beta 3$ platelets, in a cross-react with plasma proteins. The integrin $\alpha v \beta 3$ is also intensely stimulated in tumor angiogenesis processes. The Insularin (GST-INS) is a recombinant disintegrin from Bothrops insularis venom capable of inhibiting platelet aggregation via ADP as well as endothelial cell adhesion to fibrinogen. Thus, the aim of this study was to evaluate the GST-INS's ability in inhibiting angiogenesis; in adhesion of endothelial cells (HUVEC) and human melanoma (SK-MEL-28) to platelets and tumor cell invasion, using in vitro assays. The viability of the strain used as control L929 (murine fibroblast) was not compromised by treatment with the GST-INS in different concentrations and incubation times. In static conditions, GST-INS was able to completely inhibit the adhesion of HUVECs cells and SK-MEL-28 to platelets compared to control and Aggrastat® (selective inhibitor of integrin $\alpha IIb \beta 3$). In addition to inhibiting TCIPA (platelet aggregation induced by tumor cells) GST-INS also inhibited SK-MEL-28 on matrigel invasion substrate. Finally, t.End.1 cells (murine endothelium) or SK-MEL-28 preincubated with disintegrin were not able to form tubules in matrigel substrate. Preliminary results obtained by confocal microscopy show that GST-INS binds to integrin αv present in SK-MEL-28 cells. The role of GST-INS in inhibiting cell adhesion, inhibition of TCIPA and inhibition of tubule formation by endothelial and tumor cells suggests that the disintegrin may be used as a potential tool in the study and development of antagonists which act as antiangiogenic and antimetastatic.

Keywords: Integrins. Platelet. Melanoma. Endothelial cells. Cell adhesion. Disintegrin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representando a estrutura da pele.....	21
Figura 2 - Adesão célula-célula por melanócitos e células de melanoma.....	23
Figura 3 - O microambiente de um tumor primário.....	24
Figura 4 - O papel das plaquetas durante a metástase.....	25
Figura 5 - Família de integrinas.....	27
Figura 6 - Visão geral das cascatas de sinalização ativadas por integrinas.....	28
Figura 7 - Ativação das integrinas e a sinalização <i>inside-out</i> e <i>outside-in</i>	29
Figura 8 - Ativação plaquetária.....	32
Figura 9 - Interação plaqueta-célula tumoral-célula endotelial via integrinas $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ e $\alpha\text{v}\beta\text{3}$	34
Figura 10 - Classes de SVMPs: Metaloproteinases antes e depois do processamento.....	38
Figura 11 - Esquema representativo da expressão e purificação da proteína recombinante GST-INS.....	44
Figura 12 - Ensaio de agregação plaquetária (A) no agregômetro e seu registro experimental (B).....	45
Figura 13 - Esquema representativo do ensaio de agregação plaquetária.....	46
Figura 14 - Esquema representativo do ensaio de adesão <i>in vitro</i>	52
Figura 15 - Esquema representativo do ensaio de invasão celular <i>in vitro</i>	53
Figura 16 - Esquema representativo do ensaio de formação de túbulos <i>in vitro</i>	54

Figura 17 - Esquema representativo do ensaio de imunofluorescência.....	55
Figura 18 - Gel de poliacrilamida da proteína GST-INS.....	57
Figura 19 - Análise da citotoxicidade por MTT em fibroblastos (L929) tratados com GST-INS.....	59
Figura 20 - Análise da citotoxicidade por Azul de Tripan em fibroblastos (L929) tratados com GST-INS.....	61
Figura 21 - Microscopia de contraste de fase de fibroblastos (L929) tratados com GST-INS.....	62
Figura 22 - Avaliação da ação da proteína GST-INS na inibição da agregação plaquetária.....	64
Figura 23 - Microscopia de contraste de fase das amostras utilizadas no agregômetro.....	65
Figura 24 - Avaliação da ação da proteína GST-INS na inibição da agregação plaquetária dependente de ADP.....	65
Figura 25 - Indução da agregação plaquetária por células SK-MEL-28.....	66
Figura 26 - Microscopia de contraste de fase: indução da agregação plaquetária por células tumorais SK-MEL-28.....	67
Figura 27 - Microscopia de contraste de fase: células tumorais SK-MEL-28 na presença de PPP.....	68
Figura 28 - Avaliação da ação da proteína GST-INS na inibição da agregação plaquetária induzida por SK-MEL-28 em diferentes concentrações.....	69
Figura 29 - Microscopia de contraste de fase da amostra GST-INS.....	69
Figura 30 - Avaliação da ação da droga Aggrastat® na inibição da agregação plaquetária induzida por SK-MEL-28 em diferentes concentrações.....	70
Figura 31 - Microscopia de contraste de fase da amostra Aggrastat®.....	71

Figura 32 - Análise da capacidade da proteína GST-INS na inibição da adesão de SK-MEL-28 às plaquetas, em condições estáticas.....	72
Figura 33 - Análise da capacidade da proteína GST-INS na inibição da adesão de SK-MEL-28 às plaquetas na dose de 0,25 µM.....	72
Figura 34 - Adesão de SK-MEL-28 às plaquetas imobilizadas.....	73
Figura 35 - Análise da capacidade da proteína GST-INS na inibição da adesão de HUVECs às plaquetas, em condições estáticas.....	74
Figura 36 - Análise da capacidade da proteína GST-INS na inibição da adesão de HUVECs às plaquetas na dose de 0,25 µM.....	75
Figura 37 - Adesão de HUVECs às plaquetas imobilizadas.....	76
Figura 38 - Análise da capacidade da proteína GST-INS na inibição da adesão de L929 às plaquetas, em condições estáticas.....	77
Figura 39 - Análise da capacidade da proteína GST-INS na inibição da adesão de L929 às plaquetas na dose de 0,25µM.....	77
Figura 40 - Análise da capacidade da proteína GST-INS na inibição da invasão de células SK-MEL-28 ao matrigel.....	79
Figura 41 - Microscopia de contraste de fase de células t.End.1 em substrato de matrigel. Análise da capacidade da proteína GST-INS na inibição da formação de túbulos por células t.End.1.....	81
Figura 42 - Microscopia de contraste de fase de células SK-MEL-28 em substrato de matrigel. Análise da capacidade da proteína GST-INS na inibição da formação de túbulos por células SK-MEL-28.....	83
Figura 43 - Expressão de integrina αv em células SK-MEL-28 tratadas com GST-INS.....	85
Figura 44 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de plaquetas com células SK-MEL-28 tratadas com GST-INS.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP - Adenosine Diphosphate ou Adenosina Difosfato

AKT - Também conhecido como PKB (Protein Kinase B)

ALCAM - Activated leukocyte cell adhesion *molecule* ou Molécula de adesão de leucócito ativado

ATP - Adenosine Triphosphate ou Adenosina Trifosfato

Apaf-1 - *Apoptotic protease activating factor 1*

BAD - *Bcl-2 associated death promoter*

BAX - *Bcl-2 associated X protein* ou Proteína X associada ao Bcl-2

Bcl-2 - *B-cell lymphoma 2*

bFGF - *Basic fibroblast growth factor* ou Fator de crescimento fibroblástico básico

BIM - Bcl-2 like protein 11

BRAF - Gene que traduz a proteína B-Raf, que faz parte da família Raf

CCL-2 - Citocina pertencente à família de quimiocinas CC, que também é conhecida como proteína quimiotática de monócitos-1(MCP-1)

DMSO - Dimetil Sulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EMT - *Epithelial-mesenchymal transition* ou transição epitélio mesênquima

ERK - *Extracellular Signal-Regulated Kinases* ou Quinases reguladas por sinalização extracelular

FAK - *Focal adhesion kinase* ou quinase de adesão focal

GAP - Canais intercelulares que permite transferência direta (célula-célula) de íons e pequenas moléculas

GST-INS - Insularina recombinante fusionada a Glutathione S Transferase

GST - Glutathione S Transferase

IC50 - Concentração de inibição de 50% da inibição máxima

IRS-1 - *Insulin receptor substrate 1* ou Substrato do receptor de insulina 1

L1-CAM - *L1 Neural cell adhesion molecule* ou molécula L1 de adesão de célula neural

MEK - Proteínas quinase da via MAPK

MAPK - *Mitogen activated protein kinase* ou Proteína quinase ativada por sinal mitogênico

MEC - Matriz extracelular

Me1-CAM - *Melanoma cell adhesion molecule* ou molécula de adesão de células de melanoma

MMP2 - Metaloproteinase de matriz 2

MMP9 - Metaloproteinase de matriz 9

MTT - Brometo de (3- (4,5- dimetiltiazol – 2-il) -2,5 difeniltetrazólio

NFκB - *Fator nuclear kappa B*

NK - Célula *Natural Killer*

NRAS - Gene da família RAS que codifica a proteína N-Ras (N por sua identificação inicial em Neuroblastoma)

P53 - Proteína que regula o ciclo celular, reparo de DNA e morte celular por apoptose

PAF - Fator de ativação plaquetária

PAGE - *Polyacrylamide gel electrophoresis* ou Eletroforese em gel de Poliacilamida

PBS - *Phosphate saline buffer* ou Tampão fosfato salino

PCK - *Protein kinase C* ou Proteína quinase C

PI3K - *Phosphoinositide 3-kinase*

PTEN - *Phosphatase and tensin homolog*, regula negativamente a via de sinalização de AKT

RAF - *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*, gene que codifica proteínas da família Raf, envolvidas na cascata de MAPK

RAS - *Rat sarcoma*, gene que codifica proteínas da família Ras, envolvidas na via de crescimento celular, diferenciação e sobrevivência

SBF - *Serum bovine fetal* ou soro fetal bovino

SDS - *Sodium dodecyl sulfato* ou Dodecil sulfato de sódio

Scr - Família de proteínas tirosina-quinases

SVMPs - *Snake venom metalloproteinases* ou metaloproteínases de venenos de serpentes

TCIPA - *Tumour cell-induced platelet aggregation* ou agregação plaquetária induzida por células tumorais

VCAM-1 - *Vascular cell adhesion molecule 1* ou molécula de adesão celular vascular 1

VEGF - *Vascular epithelial growth factor* ou fator de crescimento de epitélio vascular

Wnt - Via de sinalização conservada evolutivamente que regula aspectos da célula durante o desenvolvimento embrionário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	41
2.1 Geral.....	41
2.2 Específicos.....	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Expressão e purificação da insularina recombinante GST-INS e da proteína controle GST.....	43
3.2 Eletroforese das proteínas recombinantes em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	44
3.3 Ensaio de Agregometria.....	45
3.4 Ensaio de Citotoxicidade- MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]- 2,5-difeniltetrazólio).....	47
3.5 Ensaio de Citotoxicidade- Exclusão por Azul de Tripán.....	47
3.6 Obtenção de plaquetas lavadas.....	48
3.7 Linhagens Celulares.....	49
3.8 Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares.....	50
3.9 Ensaio de agregação plaquetária induzida pelas células tumorais (TCIPA).....	50
3.10 Ensaio de Adesão Celular (HUVEC, SK-MEL-28 ou L929) às plaquetas, em condições estáticas.....	51
3.11 Ensaio de Invasão Celular.....	52
3.12 Ensaio de formação de túbulos <i>in vitro</i> por células endoteliais ou por melanoma humano.....	53
3.13 Ensaio de imunofluorescência (Microscopia Confocal).....	54
3.14 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	56
3.15 Análise estatística.....	56
4 RESULTADOS	57
4.1 Quantificação das proteínas recombinantes GST-INS e GST (proteína controle).....	57
4.2 Análise da expressão da GST-INS por SDS-PAGE.....	57

4.3	Análise do efeito da proteína GST-INS na viabilidade celular de fibroblastos (L929) através de ensaio por MTT.....	58
4.4	Análise do efeito da proteína GST-INS na viabilidade celular de fibroblastos (L929) através de ensaio por exclusão de Azul de Tripán.....	60
4.5	Avaliação da proteína GST-INS na inibição da agregação plaquetária in vitro.....	63
4.6	Avaliação da agregação plaquetária induzida por células tumorais (TCIPA) SK-MEL-28 ou HeLa.....	66
4.7	Avaliação da GST-INS ou GST na inibição da agregação plaquetária induzida por células SK-MEL-28.....	68
4.8	Análise da capacidade da GST-INS na inibição da adesão de células SK-MEL-28 às plaquetas, em condições estáticas.....	71
4.9	Análise da capacidade da GST-INS na inibição da adesão de células HUVECs às plaquetas, em condições estáticas.....	73
4.10	Análise da capacidade da GST-INS na inibição da adesão de fibroblastos (L929).....	76
4.11	Análise da capacidade da GST-INS na inibição da invasão de células SK-MEL-28 ao substrato de Matrigel.....	78
4.12	Análise da capacidade da GST-INS na inibição da formação de túbulos por células endoteliais t.End.1 em Matrigel.....	80
4.13	Análise da capacidade da GST-INS na inibição da formação de túbulos por SK-MEL-28.....	82
4.14	Análise da interação da GST-INS com integrinas de células SK-MEL-28.....	84
4.15	Microscopia eletrônica de varredura de plaquetas com células SK-MEL-28.....	86
5	DISCUSSÃO.....	88
6	CONCLUSÕES.....	98
	REFERÊNCIAS.....	99

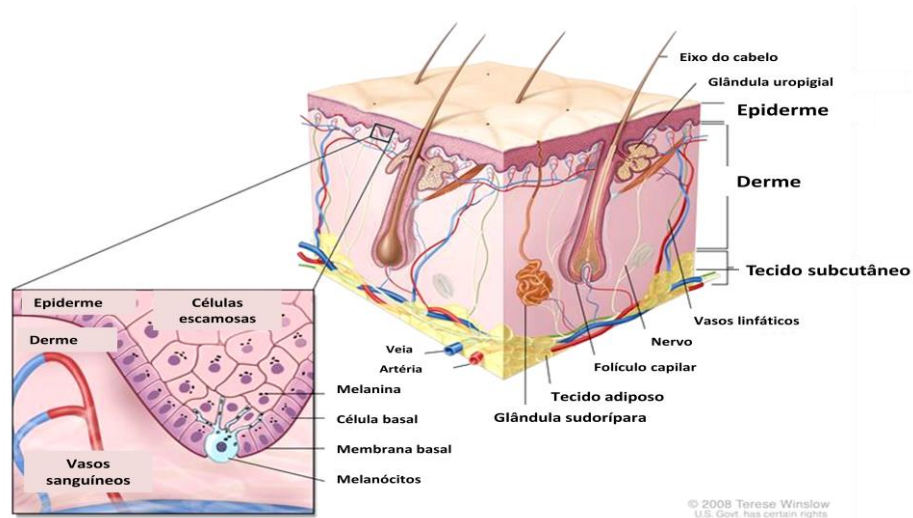
1 INTRODUÇÃO

A despeito dos avanços no desenvolvimento de novas abordagens para o diagnóstico e tratamento, o câncer ainda é um dos maiores responsáveis pela morbidade e morte no mundo, totalizando 8,2 milhões das causas de todas as mortes globalmente (GLOBOCAN, 2012). Nos Estados Unidos são estimados 1.685.210 novos casos de câncer para 2016, sendo 4.600 casos diagnosticados ao dia e 595.690 mortes causadas pela doença (SIEGEL et al., 2016).

Nas últimas décadas, em populações caucasianas, o melanoma tem aumentado acentuadamente em todo o mundo, sendo o responsável por 80% das mortes por câncer de pele (PALUNCIC et al., 2016). Dados do Instituto Nacional do Câncer estimam que em 2016, 5.670 novos casos de melanoma surgirão no Brasil (INCA, 2016).

O melanoma cutâneo trata-se de um tipo de câncer de pele originado nos melanócitos. Os melanócitos são células produtoras de melanina (substância essa que determina a coloração da pele) que estão localizadas na camada basal da epiderme (Figura 1). Um melanócito aparece a cada 10 células basais, produzindo a melanina que é distribuída para as camadas superiores, originando cor à pele e oferecendo proteção ao DNA celular contra a radiação ultravioleta (UV) (CUCÉ; FESTA-NETO, 2001).

Figura 1- Esquema representando a estrutura da pele.



Principais tipos celulares (células escamosas, células basais e melanócitos) que constituem as camadas da pele (epiderme e derme).

Fonte: Adaptado de National Cancer Institute, 2008.

O melanoma é altamente agressivo e embora apresente menor frequência (~4%), 80% dos casos são letais, com prognóstico de morte de 6 a 9 meses e sobrevivida por mais de 3 anos inferior a 15% (BALCH et al., 2009; NIKOLAOU et al., 2012).

Dados da literatura destacam a capacidade de células de melanoma sobreviverem mesmo sobre estresse metabólico e terapêutico, pois possuem mecanismos eficientes de resistência intrínseca e/ou adquirida o que os tornam recidivos aos tratamentos existentes (LA PORTA, 2009). Assim, considerando que o melanoma metastático é quase totalmente resistente à maioria das terapias atuais, a busca por novas abordagens terapêuticas direcionadas ao tratamento de melanoma torna-se desafiador e imprescindível.

As principais vias de sinalização intracelular relacionadas à patogênese desta doença incluem a MAPK clássica (isto é, RAS-RAF-MEK-ERK), WNT e a via PI3K. Estas vias desempenham um importante papel na definição da progressão do melanoma, e algumas têm sido objeto de recentes estratégias farmacológicas para tratar esta doença agressiva (PALUNCIC et al., 2016).

Cerca de 60% dos melanomas malignos apresentam mutação no gene BRAF (presente também em 7% de todos os tumores malignos). O gene BRAF codifica uma serina/treonina quinase citoplasmática (B-Raf) que desempenha um importante papel na sinalização de vias relacionadas à proliferação e diferenciação celular (FLAHERTY; MC ARTHUR, 2010).

A utilização de alvos farmacológicos dirigidos à proteína BRAF revolucionou o tratamento de melanoma. Testes clínicos (Fase I) com o Verunafinibe, (um inibidor específico de BRAF) mostrou significativa regressão tumoral em pacientes que apresentavam 81% desta mutação (FLAHERTY; MC ARTHUR, 2010). No entanto, em longo prazo, os tumores tornaram-se resistentes a este composto, apresentando um período de sobrevida sem o tumor de 7 meses em média (APLIN et al., 2011; SMALLEY; SONDAK, 2010).

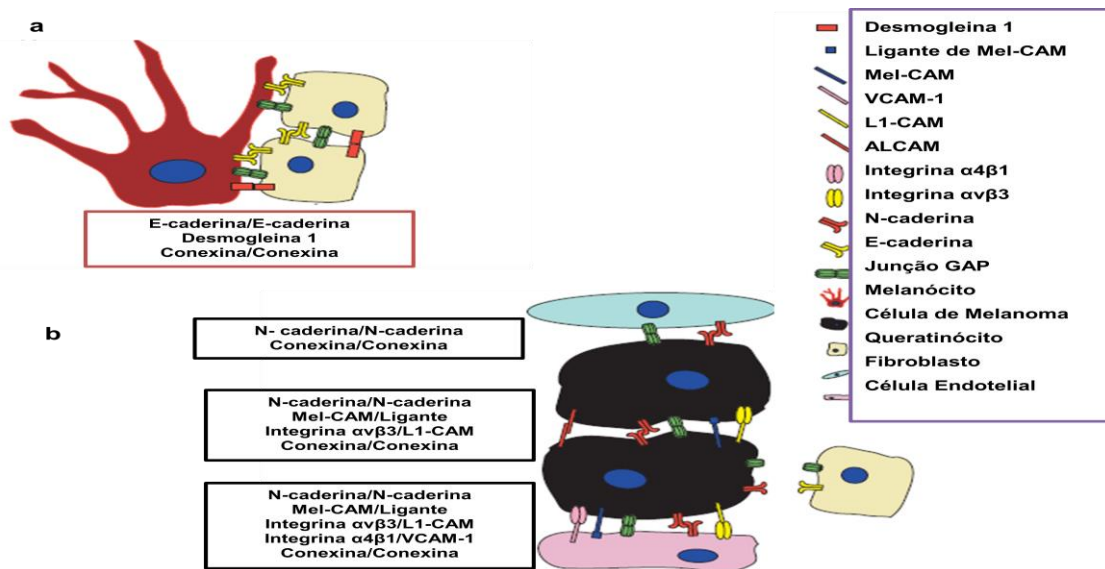
A resistência terapêutica aos inibidores de BRAF gerou extensas investigações dos mecanismos pelos quais o melanoma torna-se recidivo a estes compostos farmacológicos. Dentre os possíveis mecanismos envolvidos, estudos têm mostrado que a via de MAPK é reativada e há um aumento no nível de expressão de membros da família anti-apoptótica Bcl-2; diminuição dos fatores pró-apoptóticos como Apaf-1, BAD e BIM e também constante ativação da via PI3K/AKT (SMALLEY, 2010; SOENGAS; LOWE, 2003).

A via de PI3K/AKT está relacionada ao crescimento celular, proliferação, sobrevivência, e motilidade celular e encontra-se frequentemente ativada em melanoma (DAVIES et al., 2002; FECHER et al., 2009; SMALLEY, 2010). Ensaios pré-clínicos utilizando um inibidor da via PI3K (PX-866) têm demonstrado diminuição no crescimento e invasão em cultura 3D de esferóides *in vitro* (agregados esféricos de células tumorais formados sob condições de estresse; sinergismo celular a fim de auxiliar na sobrevida do tumor (HOWES et al., 2007).

O crescimento dos melanócitos é controlado por células adjacentes, como os queratinócitos circundantes (Figura 2). Esse mecanismo de controle pode ocorrer por (1) comunicação extracelular, via fatores parácrinos; (2)

comunicação intracelular, por mensageiros secundários e transdução de sinais e por (3) comunicação intercelular, dado por junções comunicantes (GAP) e moléculas de adesão célula-célula/ célula-matriz extracelular (HAASS et al., 2005).

Figura 2 - Adesão célula-célula por melanócitos e células de melanoma.



Melanócitos se aderem aos queratinócitos via E-caderina e desmogleína, o que permite a comunicação entre si através de junções GAP (a). Em células de melanoma a E-caderina é pouco expressa, assim a interação celular ocorre via N-caderina, Mel-CAM/Ligante Mel-CAM, $\alpha\beta 3$ /L1-CAM, ALCAM e conexinas; com fibroblastos através de N-caderina e conexina; e com células endoteliais através de N-caderina, Mel-CAM/Ligante Mel-CAM, $\alpha\beta 3$ /L1-CAM, $\alpha 4\beta 1$ /VCAM-1 e conexina.

Fonte: Adaptado de HAASS et al., 2005.

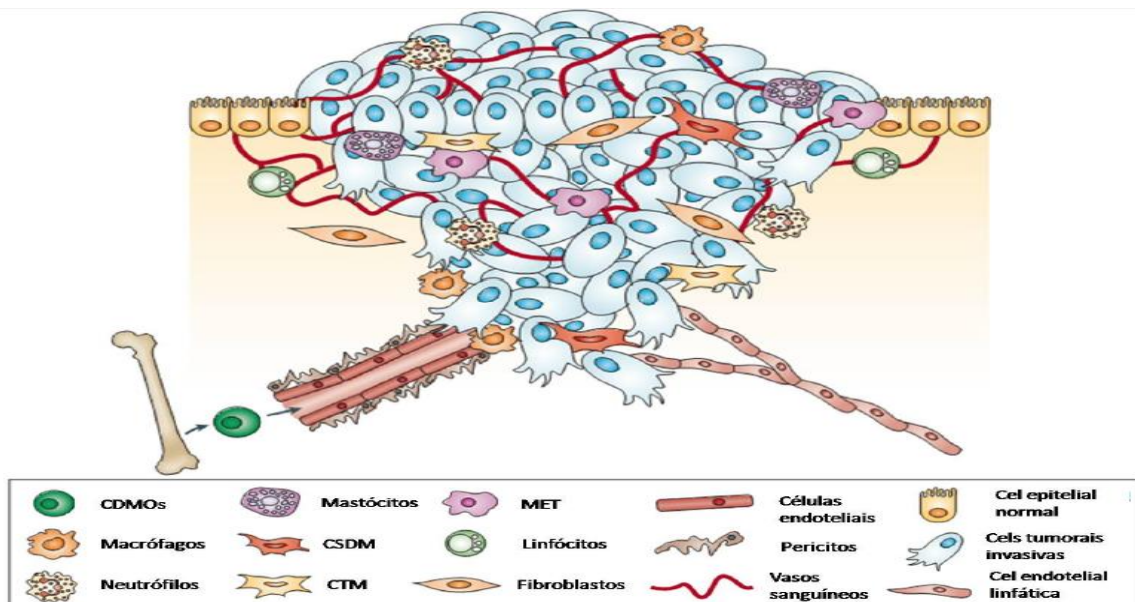
Os tumores sólidos são característicos por seu descontrole proliferativo, desarranjo celular, alterações morfológicas, invasão e capacidade de espalhamento metastático para órgãos distantes. Estas características podem ser atribuídas a alterações na adesão e na comunicação de células neoplásicas e células normais presentes no microambiente ao qual se inserem (PARK et al., 2000).

As interações que ocorrem entre células cancerosas e seus arredores desencadeiam estímulos essenciais de sinalização que determinam seu destino e influenciam na evolução de um fenótipo maligno. Além disso, alterações na hemostasia por inflamações ou infecções, envelhecimento, toxinas ou radiações, podem comprometer a integridade estrutural do tecido

e assim favorecer a tumorigênese (GRIVENNIKOV et al., 2010; QUAIL; JOYCE, 2013).

O complexo ambiente tecidual pode favorecer o crescimento do tumor, oferecendo estímulos para sua progressão e extravasamento. Interações bidirecionais ocorrem na interface entre células malignas geneticamente instáveis e seu meio (Figura 3), processo esse que determina seu potencial de propagação (GROUBRAN et al., 2014; JOYCE ; POLLARD, 2009).

Figura 3 - O microambiente de um tumor primário.



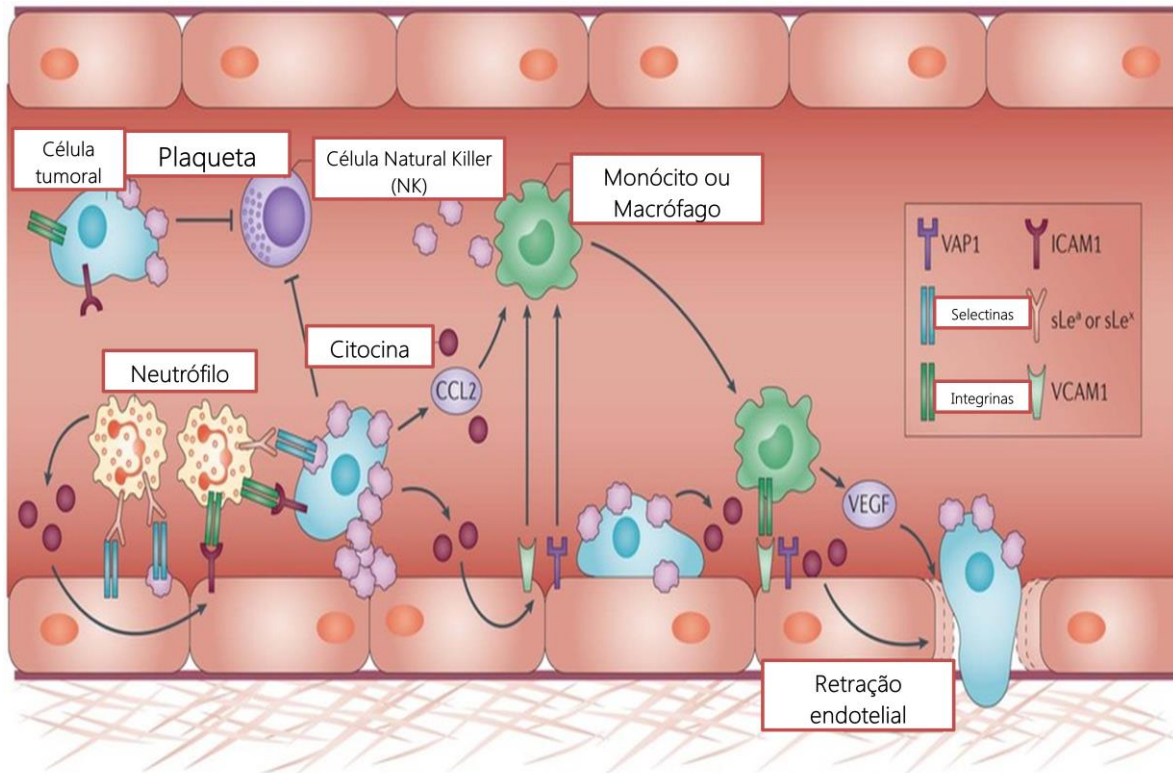
Em um tumor primário, além das células cancerígenas, diferentes tipos celulares que incluem células endoteliais, fibroblastos, células derivadas da medula óssea (CDMO), macrófagos, células supressoras derivadas da linhagem mielóide (CSDM), monócitos e células tronco mesenquimais (CTM) compõem o complexo microambiente tumoral, favorecendo seu crescimento e extravasamento.

Fonte: Adaptado de JOYCE e POLLARD, 2009.

A tumorigênese e metástase são processos cujos mecanismos estão interligados, onde incluem angiogênese e crescimento tumoral, descolamento de células tumorais de um tumor primário, seguido por migração pelo tecido conjuntivo e intravasamento na circulação. Durante a circulação sanguínea, células tumorais ficam expostas às proteínas do plasma e células do sangue que podem afetar não só a sobrevivência e reconhecimento do tumor pelo sistema imunológico (como por células NK), mas também o extravasamento e

proliferação secundária em órgãos distantes, contando com a importante participação das plaquetas (Figura 4) (LIU et al., 2009).

Figura 4 - O papel das plaquetas durante a metástase.



Nature Reviews | Cancer

Células cancerosas interagem com as plaquetas logo nos estágios precoces da metástase. As plaquetas são capazes de revestir células tumorais, protegendo-as do ataque das células NK (natural killer). Além disso, plaquetas também auxiliam na adesão de células tumorais com células endoteliais e na produção de substâncias que aumentam a extravasamento e o recrutamento de leucócitos, incluindo os neutrófilos. Células tumorais secretam quimiocinas (como a CCL2) e outros mediadores inflamatórios capazes de induzir um aumento na expressão de moléculas de adesão celular vascular, permitindo o recrutamento de células mielóides, tais como macrófagos ou monócitos que estimulam o extravasamento e sobrevivência tumoral através da secreção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

Fonte: Adaptado de REYMOND et al., 2013.

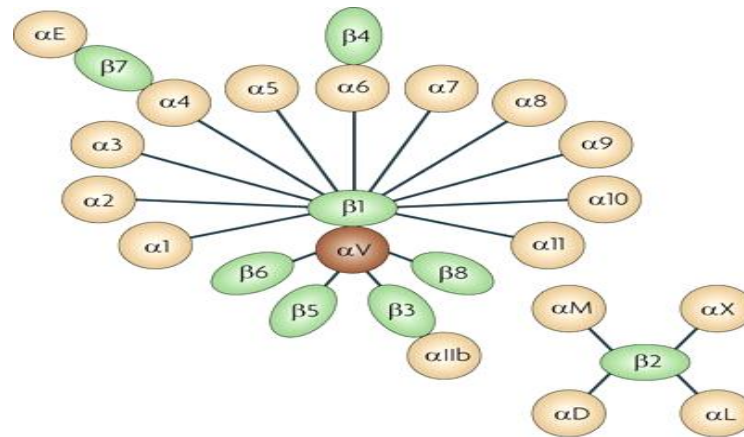
Recentemente evidências clínicas e experimentais têm demonstrado o importante papel de plaquetas na promoção do crescimento tumoral e metástases (GAY et al., 2011; LIU et al., 2009; LONSDORF et al., 2012). Muitas células derivadas de tumores sólidos têm a capacidade de agregar plaquetas e essa capacidade se correlaciona com o seu potencial metastático. Plaquetas ativadas por células tumorais geram uma multiplicidade de fatores que atuam reciprocamente sobre as células

tumorais, bem como outras células dentro do microambiente do tumor (YAN; JURASZ, 2016).

Dados recentes demonstram também a contribuição de plaquetas na indução à EMT (transição epitélio mesênquima) (LABELLE et al., 2012), quimioatração de células tumorais (ORELLANA et al., 2015), angiogênese e remodelamento vascular (GAY et al., 2011). Com isso, pesquisas têm buscado maneiras de compreender os mecanismos de interações entre plaqueta-célula tumoral-célula endotelial, com o intuito de auxiliar no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos na regulação do câncer.

Durante a progressão tumoral, receptores transmembrânicos, como as caderinas, selectinas, moléculas de adesão intercelular e integrinas, são cruciais para a adesão e invasão tumoral. Dentre estas moléculas de adesão, as integrinas e os seus precursores de sinalização têm sido extensivamente estudados (ALENGHAT; INGBER, 2002; JALALI et al., 2001).

Integrinas compreendem uma família de receptores transmembranares heterodiméricos os quais medeiam às interações célula-célula e célula-matriz extracelular (MEC). Estruturalmente são constituídas por uma subunidade α e β associadas de forma não covalente, que estão envolvidas na transdução de sinais, através de interações da sua cauda citoplasmática com o citoesqueleto e proteínas sinalizadoras. Até o momento, 18 subunidades α e 8 subunidades β foram descritas, estas formam 24 combinações heterodiméricas diferentes (Figura 5) (BARCZYK et al., 2010; HYNES, 1991).

Figura 5 – Família das integrinas

Nature Reviews | Drug Discovery

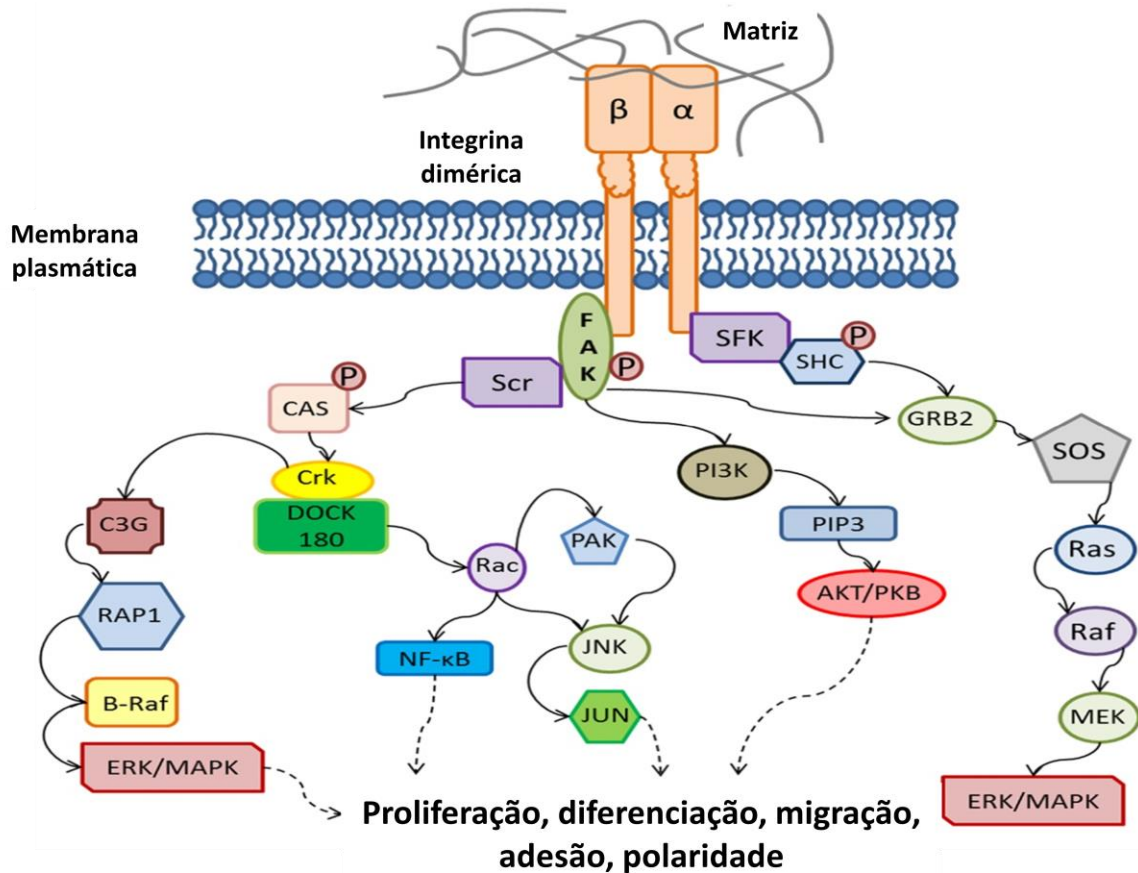
As combinações das subunidades α e β das integrinas foram 24 combinações heterodiméricas distintas.

Fonte: COX et al., 2010.

Em relação à função, as integrinas estão envolvidas numa vasta gama de atividades biológicas incluindo, o envio de sinais intracelulares e direcionamento da expressão gênica; migração celular, *rolling* de células imune, regulação do ciclo celular, crescimento, invasão, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular / apoptose (ASSOIAN; KLEIN, 2008; DESGROSELLIER; CHERESH, 2010).

As integrinas e suas caudas citoplasmáticas estão envolvidas na formação de complexos grandes de moléculas de sinalização (Figura 6) que incluem cinases da família Src (NOJIMA et al., 1995 ; PETCH et al., 1995; VUORI et al., 1996); e outras moléculas de transdução de sinal, tais como receptores do fator de crescimento (MIYAMOTO et al., 1996; PLOPPER et al., 1995; SCHNELLER et al., 1997) MAPK (MORINO et al., 1995; SCHLAEPFER et al., 1994; CHEN et al., 1994), Ras (KAPRON-BRAS et al., 1993), NF- κ B (YEBRA et al., 1995), PI3-K (CHEN; GUAN, 1994; VUORI; RUOSLAHTI, 1993; WOODS; COUCHMAN, 1992), substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) (FRISCH et al., 1996; MIYAMOTO et al., 1995).

Figura 6 - Visão geral das cascatas de sinalização ativadas por integrina.



As distintas vias de sinalização intracelulares envolvidas a partir da ativação de integrinas podem desencadear diferentes respostas celulares, tais como: proliferação, diferenciação, migração, adesão e polaridade celular.

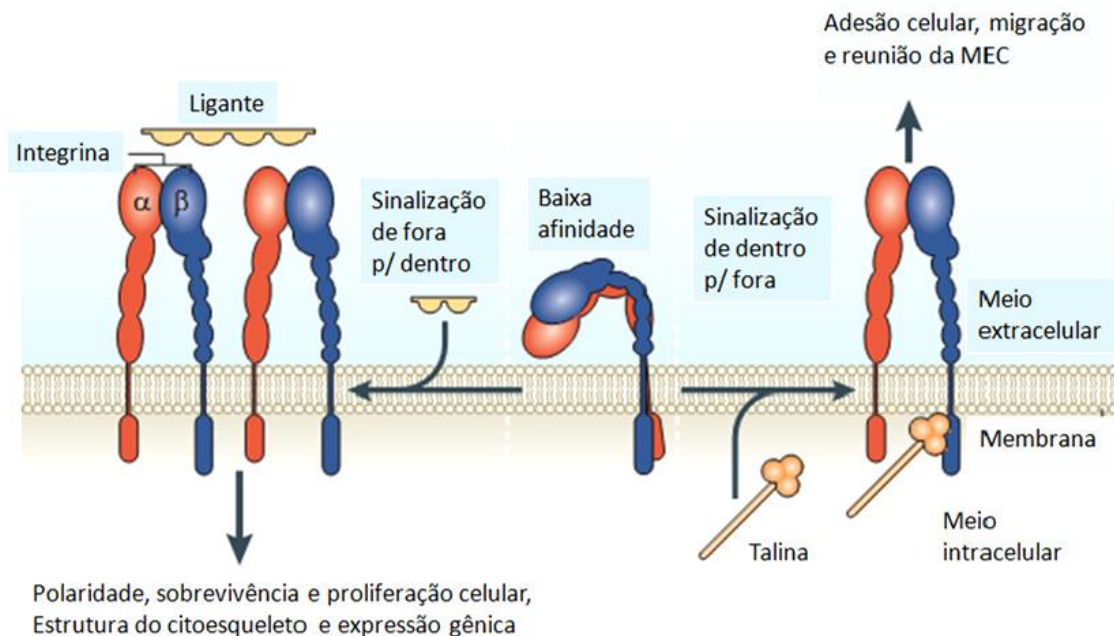
Fonte: Adaptado de SHISHIDO et al., 2014.

Em particular, as integrinas atuam como biossensores mecânicos aos quais atuam mediante o contexto. Integrinas que se ligam ao substrato imobilizado (ligante) normalmente traduzem sinais positivos à célula. Por outro lado, integrinas bloqueadas ou não ligadas a seus ligantes promovem uma sinalização negativa à célula, induzindo parada do ciclo celular e apoptose (SHATTIL et al., 2010).

O processo de sinalização das integrinas pode ocorrer de duas formas (Figura 7): (1) de fora para dentro (*outside-in*) ou (2) de dentro para fora da célula (*inside-out*). As conexões adesivas que ocorrem via integrinas é um processo regulado pelas interações proteína-proteína na cauda citoplasmática da cadeia beta, promovendo alterações na afinidade do

receptor à seus ligante e direcionando sua interação com o ambiente (SHATTIL et al, 2010).

Figura 7- Ativação das integrinas e a sinalização “inside-out” e “outside-in”.



As integrinas podem ser ativadas tanto de dentro para fora de células, quanto de fora para dentro. No centro da figura, as integrinas se encontram no estado de baixa afinidade. Fonte: Adaptado de SHATTIL et al., 2010.

Níveis de expressão de integrinas podem variar entre o tecido normal e tumoral, pois além das integrinas estarem envolvidas em eventos fisiológicos, as mesmas também possuem papel crucial na inflamação e progressão do tumor (KOISTINEN; HEINO, 2000).

Em melanoma, as integrinas mais relevantes são: $\alpha 5 \beta 1$ que se liga seletivamente a fibronectina; e a $\alpha v \beta 3$ que se liga à fibronectina, fator Von Willebrand, vitronectina, laminina, colágeno (alguns tipos) e fibrinogênio. Por possuir interação a diferentes componentes da matriz extracelular a integrina $\alpha v \beta 3$ é considerado um fator importante na propagação metastática de melanoma (VAN DER FLIER; SONNENBERG, 2001).

Somente melanócitos transformados podem sobreviver no ambiente alterado da derme e esta sobrevivência parece ser dependente da expressão das moléculas de adesão célula-matriz extracelular, tais como as integrinas. Perfis de expressão aumentados e alterados das integrinas (como a $\beta 3$) são

conhecidos como indicativos de progressão do melanoma, uma vez que melanócitos em fase precoce de crescimento não apresentam expressão dessa (VAN BELLE et al., 1999).

Outros estudos também demonstram que a expressão da subunidade αv ou da $\beta 3$ aumenta o potencial metastático de células de melanoma (FELDING-HABERMANN et al., 1992; FILARDO et al., 1995). Ensaio *in vitro*, com células de melanoma, que superexpressavam $\alpha v\beta 3$, cultivadas em substrato de vitronectina gerou um aumento relevante na ativação da quinase de adesão focal (FAK) e Src, demonstrando papel destas cinases na invasão mediada por integrina. Além disso, dados indicam que a adesão desta integrina ao colágeno aumenta a sobrevivência de células de melanoma e leva à alterações de proteínas em vias relacionadas à morte celular, como membros da família de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (por exemplo, Bax) (PETITCLERC et al., 1999).

Dados da literatura também mostram que melanócitos *in situ* expressam integrinas $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha v\beta 1$, enquanto que as integrinas $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 6$ e os heterodímeros $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$ não são expressos (KUPHAL et al., 2005).

A expressão de integrinas $\alpha v\beta 6$, $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$ são pouco expressas ou indetectáveis na maior parte dos epitélios adultos, mas altamente reguladas em tumores potencialmente malignos como mama e próstata, além do melanoma metastático humano (KREN et al., 2007). A sinalização de $\alpha v\beta 3$ envolve MAPK e PI3K/PCK. Em alguns sistemas celulares, a conversão de integrinas para o estado de alta afinidade é desencadeada pela ativação de PI3K. Ativação de integrinas podem por sua vez contribuir para a adesão e propriedades invasivas de células cancerosas. Estudos demonstraram que a adesão de células de câncer de cólon ocorre por meio de uma via de Src-dependente de PI3K/AKT (THAMILSELVAN et al., 2007). Outros trabalhos mostraram também que a ativação de integrina aumenta a expressão e a atividade de MMPs (metaloproteinases de matriz) que contribuem no processo de migração celular (TSUBAKI, 2012).

A literatura demonstra também que a expressão de integrinas por alguns tumores, está relacionada à resistência terapêutica e o bloqueio

destes receptores pode melhorar a eficácia citotóxica radioativa e quimioterápica (HODKINSON et al., 2006; ZUTTER, 2007). Vários estudos ao longo da última década têm demonstrado que a sinalização integrina/MEC fornece uma vantagem de sobrevivência para vários tipos de células cancerígenas contra inúmeros medicamentos quimioterápicos e contra a terapia de anticorpos que induzam apoptose celular (AOUDJIT; VUORI, 2012). Os eventos de sinalização, através da qual as integrinas ativam esses percursos de sobrevivência são complexos e podem ser tecidos específicos, mas estudos têm mostrado que o complexo duplo de quinase de FAK / Src está envolvido na ativação destes percursos de sobrevivência (GIANCOTTI; RUOSLAHT, 1999; MITRA; SCHLAEPFE, 2006).

Além disso, pode-se confirmar que a integrina $\alpha\beta3$ é um marcador de malignidade de alguns tumores específicos, incluindo próstata, mama e melanoma metastático humano (CHEN et al., 1994; FILARDO et al., 1995; ROLLI, et al., 2003; ZHAO, et al., 2007).

Células de melanoma invasivas e metastáticas possuem a capacidade de gerar canais vasculares a fim de facilitar a perfusão do tumor, independentemente da angiogênese induzida por células endoteliais (SEFOR et al., 2012; MANIOTIS et al., 1999). Além de superexpressarem genes relacionados à angiogênese e remodelamento de matriz, essas células tumorais também possuem propriedades anticoagulantes para facilitar o fluxo de sangue, levando rapidamente ao crescimento do tumor (BITTNER et al., 2000; DEMOU; HENDRIX, 2008).

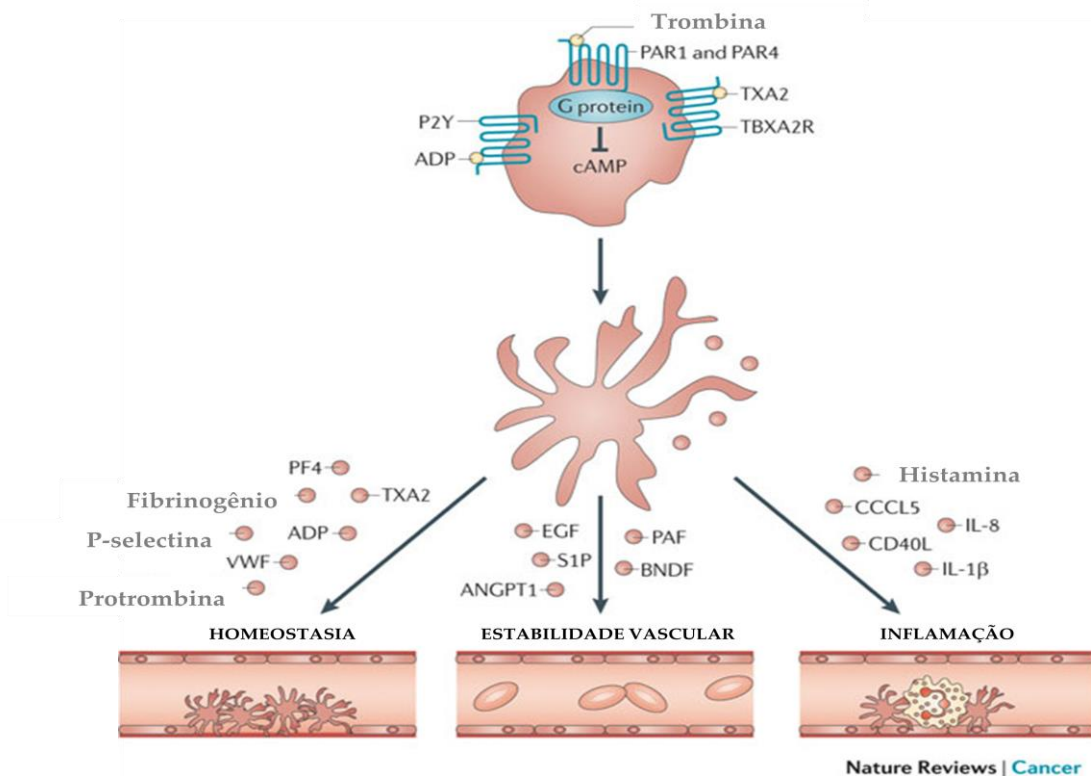
Diversos estudos têm destacado não só o papel da integrina $\alpha\beta3$, como também a relação da $\alpha\text{IIb}\beta3$ no processo de angiogênese (ELICEIRI; CHERESH, 1999; FRIEDLANDER et al., 1995; THOMPSON, et al., 2000).

Zhao et al., (2014), demonstraram o importante papel das integrinas $\alpha\text{IIb}\beta3$ e $\alpha\beta3$ na adesão e invasão de células de carcinoma de mama humano. Células MDA-MB-231 (células de carcinoma de mama) apresentaram aumento na sinalização PI3K/AKT, níveis altos na expressão de MMP-2 (Metalopeptidase de Matriz 2), MMP-9 (Metalopeptidase de Matriz 9) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), favorecendo a adesividade e o potencial metastático dessas células. Esse trabalho sugere

que tanto a ativação plaquetária, como a sinalização de PI3K/AKT contribuem significativamente para a metástase hematogênica.

As integrinas $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ estão presentes normalmente em megacariócitos, como plaquetas. A ativação plaquetária ocorre com o início da adesão estimulada por agentes químicos e mecânicos. Essa ativação (Figura 8) gera alterações no citoesqueleto resultando em alterações morfológicas e degranulação com liberação de fatores (ADP, ATP, trombina, Ca^{2+} fator plaquetário IV, serotonina, fibrinogênio, entre outras moléculas). A ativação da integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ na superfície de plaquetas ocorre basicamente com a mudança de sua conformação e independentemente do agonista e receptor inicial, a via final consiste na ligação da integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ao fibrinogênio e a formação de agregados plaquetários (HYNES, 1991).

Figura 8 - Ativação plaquetária.



Plaquetas quando ativadas sofrem alterações no citoesqueleto com consequente degranulação e secreção de fatores como ADP, P-selectina, protrombina, PAF, histamina, fibrinogênio, entre outras moléculas. Os mediadores plaquetários são importantes para o controle da homeostasia, estabilidade vascular, inflamação e também em patologias como o câncer.

Fonte: Adaptado de GAY e FELDING-HABERMANN, 2011.

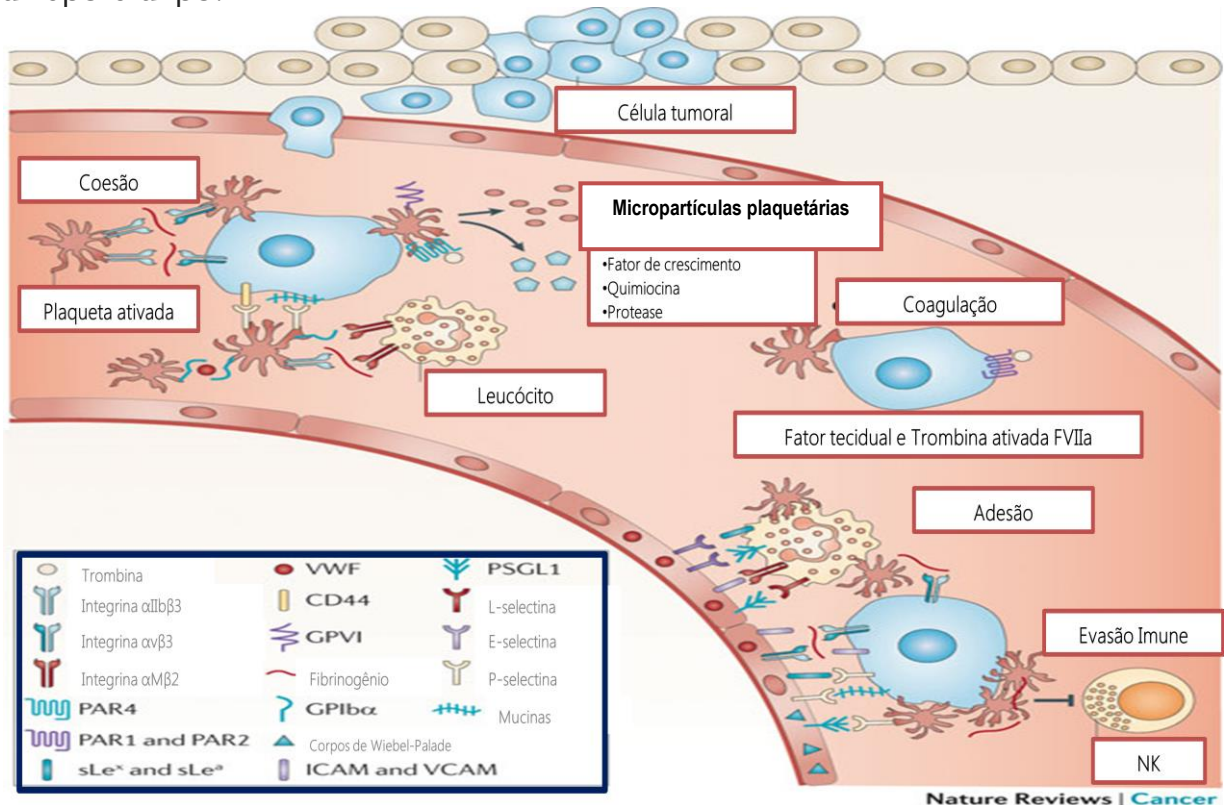
O principal ligante da $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ é o fibrinogênio, e possui um papel importante na metástase. Na biologia tumoral, o fibrinogênio contribui com a formação de êmbolos de células tumorais-plaquetas-fibrinogênio e tumor-tumor. Evidências experimentais mostram que a metástase hematogênica e a metástase linfática são significativamente inibidas em camundongos nocautes para fibrinogênio (CAMERER et al., 2004; PALUMBO et al., 2000, 2002).

Os receptores GPIIb/IIIa ($\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$) em condições anormais também podem ser superexpressos por outros tipos celulares, como em células de melanoma maligno (CHEN et al., 1997; DÖME et al., 2005). Evidências experimentais e clínicas demonstraram que o melanoma humano pode também expressar a integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ resultando em uma constitutiva ativação da fosforilação de FAK (quinase de adesão focal) um componente chave na transdução de sinal de vias intracelulares acionadas pelas integrinas (PUERSCHEL et al., 1996; RÁSÓ et al., 2001; TÍMAR et al., 1998; TRIKHA et al., 2002).

Rásó et al., (2005) utilizaram o anticorpo monoclonal (PAC-1) anti- $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ para inibição da sinalização de tirosina (envolvida na conformação ativa de $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$), da proliferação e da colonização de células de melanoma murino B16 no pulmão. Além do anticorpo ser capaz de inibir a adesão e migração, diminuiu a regulação da fosforização de FAK. A expressão de $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ em células de melanoma é importante na adesão, mobilidade e sobrevivência, além de ser um fenótipo angiogênico potente devido a expressão de fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) (DÖME et al., 2005).

Dentro desse contexto, trabalhos têm destacado a importância das integrinas $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ e $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ e sua relação na migração de células tumorais e endoteliais através de um efeito sinérgico entre essas integrinas (Figura 9) (GOMES et al., 2004; LIU et al., 2009; TRIKHA et al., 2002).

Figura 9 - Interação plaqueta-célula tumoral-célula endotelial via integrinas $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ e $\alpha\text{v}\beta\text{3}$.



Plaquetas ativadas alteram sua morfologia, aumentando sua aderência, liberando conteúdos granulares e micropartículas que auxiliam a perpetuar a coesão entre células tumorais-plaquetas-leucócitos. Grânulos plaquetários contêm fatores de crescimento, quimiocinas e proteases importantes na progressão tumoral. Durante a coesão, as células de tumor circulantes podem interagir com as plaquetas (via integrinas $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ e $\alpha\text{v}\beta\text{3}$) e leucócitos ativados, formando heterocoágulos que auxiliam na fixação das células tumorais com o endotélio (via integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$) contribuindo para a metástase. Durante as etapas iniciais de coagulação as plaquetas podem ativar receptores em células tumorais (por exemplo, receptor ativado por protease (PAR1 e PAR2) que promove a liberação de fator tecidual melhorando ainda mais a atividade pró-coagulante. A adesão inicial ocorre via selectinas, mucinas, CD44, Sialil Lewis X e é seguido pela fixação firme mediada por integrinas e moléculas de adesão intercelular. Na evasão imunológica, proteínas plasmáticas, como o fibrinogênio, formam pontes intercelulares com as plaquetas ativadas a fim de proteger as células tumorais da lise das células natural killer durante a metástase hematogênica.

Fonte: Adaptado GAY e FELDING-HABERMANN, 2011.

Anticorpos dirigidos contra $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ e $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ podem ser utilizados como potenciais inibidores no crescimento tumoral, angiogênese e metástase. Trabalhos indicam que bloqueio de $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ em células tumorais e endoteliais simultaneamente ao bloqueio de $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ em plaquetas é mais efetivo na inibição do crescimento tumoral do que quando se utiliza um inibidor seletivo para apenas um desses receptores.

No trabalho de Thrika et al., (2002), foi utilizado o anticorpo monoclonal c7E3 Fab dirigido à $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (Abciximab) para inibição da ligação

de plaquetas às células endoteliais, através da ligação à $\alpha v\beta 3$ e $\alpha IIb\beta 3$, respectivamente, além do anticorpo ligar-se a $\alpha v\beta 3$ das células endoteliais hospedeiras, em modelo xenográfico em ratos, preveniu o crescimento tumoral e a angiogênese. Além disso, estudos revelam que esse anticorpo pode potencialmente inibir a secreção de VEGF por plaquetas, que é um potente fator pró-angiogênico (AMIRKHOSRAVI et al., 1999; MOHLE et al., 1997). Gomes et al., (2004), também demonstraram que o uso combinado de Lamifiban e SB-273005, dois antagonistas seletivos para $\alpha v\beta 3$ e $\alpha IIb\beta 3$ respectivamente, ou o Abciximab, apresentaram inibição na cooperatividade dessas duas integrinas no processo de adesão celular de células de carcinoma de mama invasivo (MDA-MB-231) em componentes da matriz extracelular, bem como a participação de outros receptores adesivos presentes em células tumorais e em plaquetas. A inibição foi de aproximadamente 45%, devido a participação de integrinas, além de $\alpha v\beta 3$ e $\alpha IIb\beta 3$, envolvidas na adesão de células MDA-MB-231 à matriz-extracelular. Mesmo comprovada a eficiência do uso do anticorpo monoclonal bifuncional Abciximab (via subunidade $\beta 3$), alguns trabalhos apontam a limitação do uso desse anticorpo devido seus efeitos adversos como por exemplo, a indução de trombocitopenia (RASTI ; BLOSTEIN, 2011).

O Cilengitide é um pentapeptídeo cíclico que possui motivo RGD, com atividade antiangiogênica, sendo o primeiro medicamento tendo como alvo as integrinas $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ e $\alpha 5\beta 1$. Este composto foi descoberto no meio da década de 90, e recentemente chegou à fase III de testes clínicos para tratamento de glioblastoma. A utilização dessa molécula em conjunto com radioterapias, tem gerado bons resultados no aumento da sobrevida dos pacientes. No entanto, a utilização em outros tipos de câncer, como o de pâncreas, os resultados não foram significativamente melhores quando comparados às drogas já utilizadas na clínica (MAS-MORUNO et al., 2010).

Através de ensaios de transmigração e invasão *in vitro*, Liu et al., (2009) verificaram que a ativação plaquetária por trombina resultou num aumento de transmigração de células HeLa e que houve um decréscimo do número de células que migraram após incubação com antagonistas como o Eptifibatide, (inibidor específico para $\alpha IIb\beta 3$) e o peptídeo RGDWE. Com base

na literatura, os autores desse trabalho sugerem que agregados plaquetários poderiam revestir a superfície de uma célula tumoral, protegendo-a contra o ataque citotóxico das células NK (PALUMBO et al., 2005).

A literatura demonstra que pelo menos metade dos pacientes com câncer, tem apresentado ativação plaquetária e trombose (ABULENCIA et al., 2001; NIESWANDT et al., 2007).

A habilidade de células tumorais malignas em induzir a agregação plaquetária (TCIPA) confere um número de vantagens para o sucesso da metástase de células tumorais (GASIC et al, 1968, 1973). TCIPA também permite a embolização de grande número de agregados de tumor-plaquetas para novos sítios de extravasamento dentro da microvasculatura (MALIK, 1983). Como as células cancerosas migram de um sítio primário a um sítio metastático distante, elas co-existem com plaquetas no trombo localizado nos órgãos e sistema circulatório de pacientes com câncer metastático (GOUIN-THIBAUT ; MEHTA, 1984; SAMAM, 2001).

No trabalho de Lian et al., (2013) células de tumor de mama metastático (MCF-7) foram capazes de induzir agregação plaquetária de maneira dose-dependente, porém quando utilizado inibidores dirigidos às integrinas de ambas às células, houve uma significativa diminuição na agregação plaquetária induzida por tumor (TCIPA). Esses dados demonstram que o uso combinado de drogas antiplaquetárias e anticancerígenas pode ser uma importante estratégia no combate da metástase hematogênica.

Há uma grande necessidade na identificação de novos candidatos terapêuticos, com atividades amplamente distintas de sinalização, para inibição do desenvolvimento tumoral, de maneira que possuam o mínimo efeito adverso. Podemos encontrar na literatura trabalhos que utilizam proteínas isoladas de venenos de serpentes como importante ferramenta para o desenvolvimento de antagonistas de receptores de integrinas de adesão celular, que minimizam/impeçam o desenvolvimento da angiogênese e de coagulopatias, como por exemplo, a trombose.

Drogas derivadas do veneno de serpentes são encontradas no mercado. O Captopril® é um exemplo clássico e o primeiro a ser descoberto, trata-se de um medicamento anti-hipertensivo que inibe a enzima

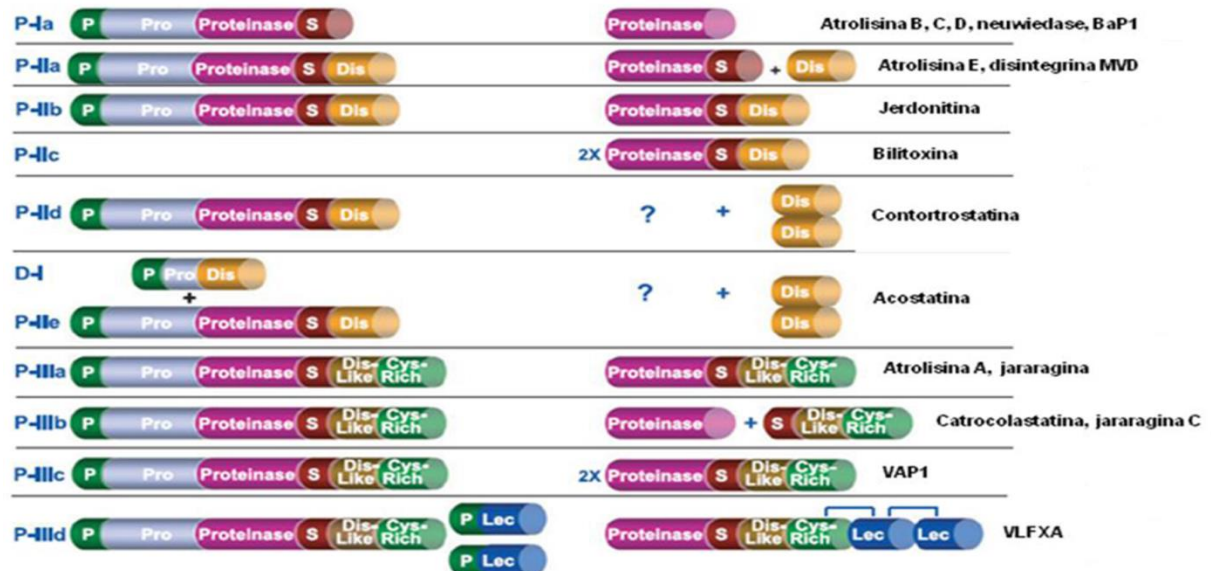
conversora de angiotensina (ECA). A molécula que serviu como molde para a síntese do Captopril®, foi isolada do veneno de *Bothrops jararaca*. Outros exemplos são os antiagregantes Eptifibatide® (Integrilin) e o Aggrastat® (inibidor específico da integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$) que foram produzidos a partir das disintegrinas barbourina e echistatina, respectivamente (KOH; KINNI, 2012). O Aggrastat® é um antagonista não peptídico do receptor de glicoproteína GPIIb/IIIa, o principal receptor plaquetário de superfície envolvido na agregação plaquetária. Esta droga atua inibindo a ligação do fibrinogênio ao receptor de GPIIb/IIIa, bloqueando, desse modo, a ligação cruzada das plaquetas e a agregação plaquetária induzida por difosfato de adenosina (ADP). Este medicamento é utilizado na clínica em pacientes com síndromes coronárias isquêmicas, submetidos à angioplastia coronária ou aterectomia, para prevenir a ocorrência de complicações coronarianas isquêmicas relacionadas ao fechamento abrupto da artéria coronária.

Extensos estudos têm sido realizados utilizando disintegrinas como novas terapias para o tratamento do câncer.

Disintegrinas pertencem a uma família de peptídeos antagonistas de integrinas, com baixa massa molecular, ricas em cisteínas e geradas naturalmente a partir do processamento proteolítico de metaloproteinases, presentes nos venenos de serpentes (SVMP) pertencentes à família *Viperidae* (FOX; SERRANO, 2008). As SVMPs podem ser classificadas (Figura 10) de acordo com o número de domínios em três principais classes: P-I, que contém somente o domínio metaloproteinase; P-II, com o domínio metaloproteinase seguido do domínio disintegrina na porção C-terminal; P-III, com um domínio adicional rico em cisteína seguido de um domínio disintegrina e em alguns casos um domínio de lectina. As disintegrinas pertencentes à classe P-II passam por um segundo processamento, retirando o domínio catalítico e dando origem as disintegrinas “clássicas” (BJARNASON; FOX, 1995; FOX; SERRANO, 2008). Essas proteínas ligam-se às integrinas por diferentes afinidades, porém a seletividade dessa interação depende de diversos fatores, como os aminoácidos adjacentes ao tripeptídeo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) conservado nas disintegrinas, regiões da molécula próximas ao motivo RGD e padrão de pontes dissulfeto

(MARCINKIEWICZ et al., 1997). RGD disintegrinas constituem a maior e mais investigada família de disintegrinas.

Figura 10 - Classes de SVMPs: Metaloproteinases antes e depois do processamento.



As SVMPs são sintetizadas da forma latente como precursores multimoduladores que sofrem diferentes estágios de processamento. **P**: pré-domínio. **Pro**: pró domínio. **Proteinase**: domínio metaloproteinase. **s**: sequência de aminoácidos entre o domínio catalítico e disintegrina ou tipo disintegrina. **Dis**: disintegrina. **Dis-Like**: domínio tipo-disintegrina. **Cys-Rich**: domínio rico em cisteína. **Lec**: domínio ligante de lectina
 Fonte: Adaptado de FOX e SERRANO, 2008.

Disintegrinas clássicas se ligam à integrinas dependentes de RGD, tais como α IIb β 3, α 5 β 1 e α v β 3 expressos na superfície de diferentes tipos de células, particularmente as plaquetas, células endoteliais vasculares e algumas células tumorais conduzindo à inibição da agregação de plaquetas ou a inibição da adesão celular, migração e angiogênese (CALVETE, 2013; HUANG et al., 2001).

Apesar da eficácia da ligação de RGD-disintegrinas à integrina α IIb β 3, inibindo de forma eficiente a agregação plaquetária, grande parte das disintegrinas ligam-se a outros membros de integrinas como β 1, β 3 ou β 5, embora, com diferentes afinidades de ligação e seletividade (MCLANE et al., 1998). Além disso, outras regiões da molécula disintegrina, também têm sido descritas como prováveis vias moduladoras de ligação a integrinas. Por exemplo, alguns estudos têm mostrado a importância dos resíduos na

extremidade da região carboxi-terminal de algumas disintegrinas na determinação da seletividade das mesmas (FUJII et al., 2003). Com isso, a heterogeneidade funcional e estrutural das disintegrinas pode ser atribuída às diferenças sutis, mas significativas, encontradas em suas características primárias e no seu caráter conformacional, contribuindo, assim, para diferentes seletividades e afinidade com ligantes.

Alguns estudos demonstram o papel de distintas disintegrinas como inibidor da progressão de tumores sólidos malignos, ou seja, no processo de angiogênese. Por exemplo, a acutinina (que contém a sequência de aminoácidos ARGDDL), a rhodostomina (que contém a sequência de aminoácidos PRGDMP) e a salmosina (que contém a sequência de aminoácidos ARGDDL) inibem tanto a viabilidade de células endoteliais de veia umbilical (HUVEC) como a migração e invasão tumoral induzida através de bFGF, bloqueando a interação de $\alpha v\beta 3$ com o componente de matriz extracelular (YEH et al., 2001). A contortostatina recombinante (que contém a sequência de aminoácidos ARGDDL) apresenta potente atividade antiangiogênica e antitumoral em linhagens de tumor de mama, quando administrada conjugada com lipossomos (SWENSON, et al., 2007). Ramos et al., (2008) avaliaram a ação da disintegrina recombinante DisBa-01 (que contém a sequência de aminoácidos ARGDDM), frente a adesão de células endoteliais HMEC-1 e tumorais B16F10 em vitronectina. Com esse trabalho, os autores verificaram a capacidade da proteína recombinante na inibição da adesão dessas células e também mostraram que a proteína inibe a proliferação tumoral, sem afetar a citotoxicidade celular e que a inibição da adesão é dependente da integrina $\alpha v\beta 3$.

Della-Casa et al., (2011) demonstraram a capacidade da insularina recombinante, GST-INS, uma disintegrina recombinante do veneno de *Bothrops insularis*, clonada e expressa em fusão com a proteína GST em sistema bacteriano, na inibição de agregação plaquetária via ADP e na inibição da adesão de HUVECs ao fibrinogênio. A GST-INS trata-se de uma disintegrina média (~73 resíduos) e que possui a sequência ARGDNP, característico de disintegrinas com grande potencial em bloquear tanto $\alpha v\beta 3$ como $\alpha IIb\beta 3$ (SCARBOROUGH et al., 1993).

Sabendo-se que os anticorpos atuam com especificidade em determinada subunidade de uma integrina ou em somente uma integrina heterodimérica, a utilização de disintegrinas torna-se promissora para o controle da progressão da doença, uma vez que se trata de uma classe de antagonistas de integrinas capazes de bloquear ao mesmo tempo múltiplos mecanismos de adesão e vias de sinalização envolvidas no processo de progressão tumoral (SHELDRAKE; PATTERSON, 2014).

Desta forma, tendo em vista que a progressão de melanoma conta com significativa participação das integrinas $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}/\alpha\text{v}\beta\text{3}$ envolvidas nos fenômenos de angiogênese e metástase hematogênica, onde essa última pode incluir a participação das plaquetas, o presente trabalho pretende avaliar o papel da GST-INS na cooperação de células endoteliais/tumorais/plaquetas, na formação de túbulos (importantes na angiogênese e vasculogênese de melanoma), na agregação plaquetária induzida por melanoma.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da insularina recombinante (GST-INS) em alguns fenômenos da progressão tumoral como agregação plaquetária induzida por células tumorais (TCIPA), angiogênese, vasculogênese e adesão tumor/plaqueta/endotélio através de ensaios *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade da insularina recombinante (GST-INS) na inibição da adesão de células endoteliais (HUVECs) e de melanoma humano (SK-MEL-28) às plaquetas por ensaio em condições estáticas (ensaio de adesão em fase sólida);
- Avaliar a capacidade da insularina recombinante (GST-INS) na inibição da TCIPA (agregação plaquetária induzida por tumor) por ensaios de agregometria;
- Avaliar o papel da insularina recombinante (GST-INS) na inibição da invasão de células de melanoma (SK-MEL-28) *in vitro*;
- Avaliar a capacidade da insularina recombinante (GST-INS) na inibição da formação de túbulos por células endoteliais t.End.1 e por células de melanoma (SK-MEL-28) em substrato de matrigel;
- Avaliar por Microscopia Confocal a interação da insularina recombinante (GST-INS) com integrina αv de melanoma humano (SK-MEL-28).

- Avaliar por Microscopia Eletrônica de Varredura a interação entre plaquetas e células de melanoma (SK-MEL-28) na presença da insularina recombinante (GST-INS)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

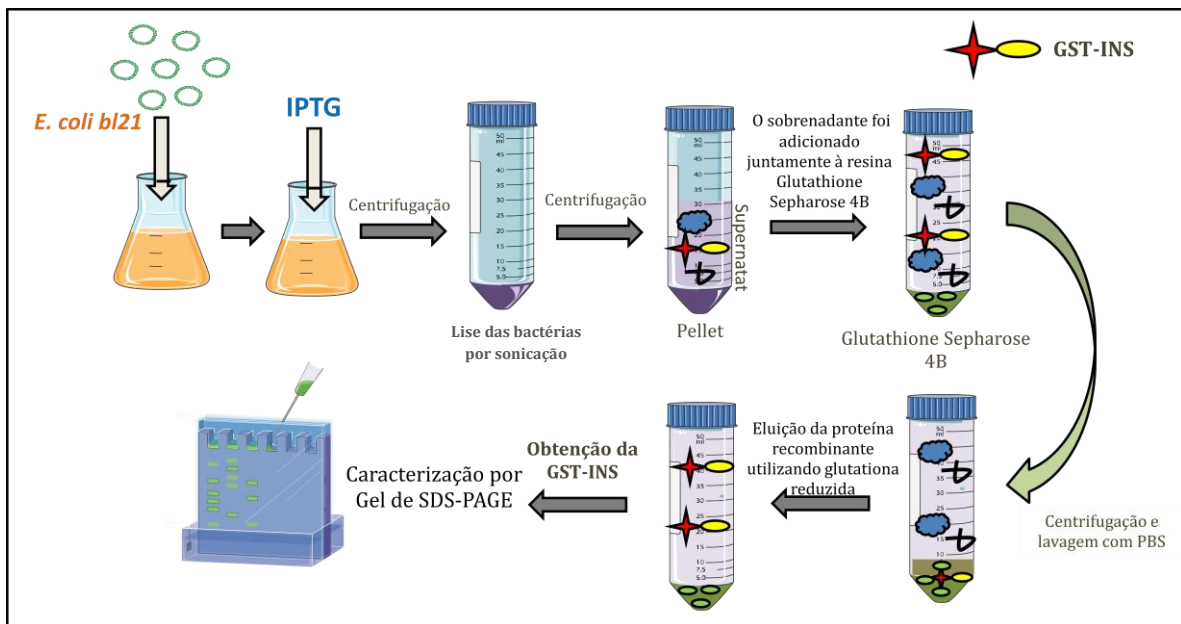
3.1 Expressão e purificação da insularina recombinante GST-INS e da proteína controle GST

Uma colônia isolada da cepa BL21 de *E. coli*, contendo o plasmídeo que contém a sequência da insularina pGEX-4T-1/INS ou o plasmídeo vazio pGEX-4T-1 foi inoculada em 10 mL de meio LB, contendo 50 mg/mL de ampicilina e incubada sob agitação a 200 rpm por 18 horas a 37 °C. A seguir, foi realizado uma diluição de 1:50 dos pré-inóculos em 200 mL de meio LB contendo 50 mg/mL de ampicilina, incubando-se as culturas novamente a 37 °C até $DO_{600} = 0,6-0,8$ (densidade óptica de absorbância). Após o período de 4 horas, a expressão foi induzida com 1 mM de IPTG por aproximadamente 3 horas. Após a incubação, as células foram coletadas através de centrifugação, suspensas em 10 mL de PBS e lisadas em sonicador (amplitude de 65 e um pulso de 5 segundos durante 8 minutos). Os extratos solúveis foram obtidos por centrifugação e os sobrenadantes adicionados a 400 μ L da resina de Glutathione Sepharose 4B (AMERSHAM PHARMACIA) para a ligação da região da proteína da GST (Glutathione S-Transferase).

As soluções que continham os extratos solúveis incubados com a resina foram mantidas sob agitação por 1 hora a 25 °C. Após extensivas lavagens com PBS, as proteínas recombinantes foram eluídas num volume de 2 mL, através da adição de tampão de eluição contendo 10 mM de glutathione reduzida e 50 mM de Tris/HCl, pH 8,0. As amostras eluídas foram dialisadas contra PBS, pH 7,4 por 18 horas.

A quantificação das proteínas recombinantes foi realizada por análise em espectrofotômetro mediante leitura da absorbância a 280 nm. Para comprovação da preservação da atividade biológica da proteína recombinante realizamos o teste de inibição da agregação plaquetária.

Figura 11 - Esquema representativo da expressão e purificação da proteína recombinante GST-INS.



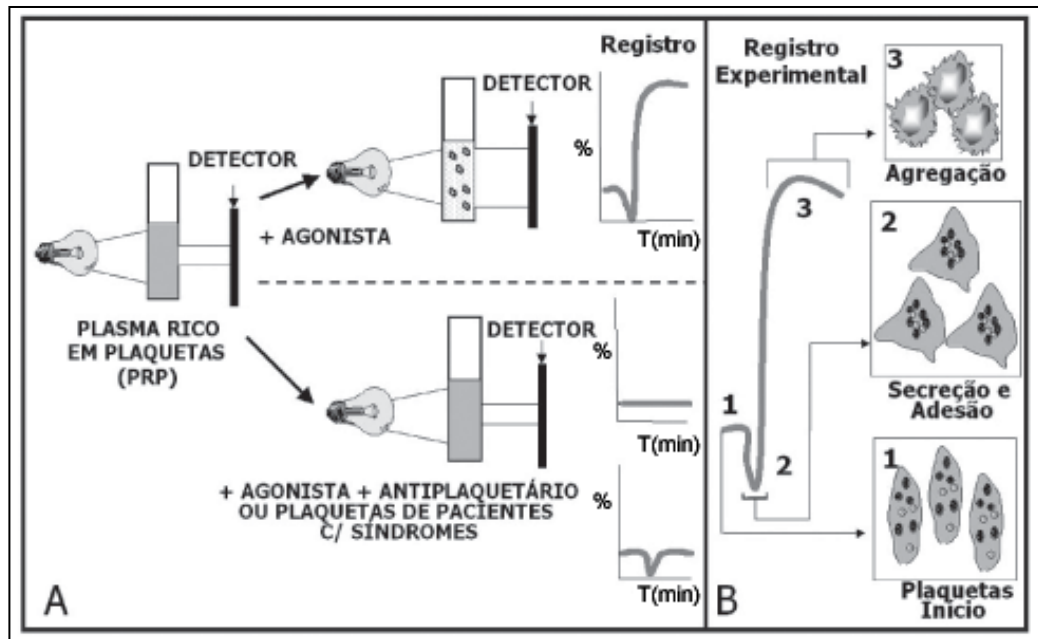
3.2 Eletroforese das proteínas recombinantes em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As proteínas purificadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS. As amostras (5 µg), correspondentes à GST-INS ou GST, foram diluídas em um mesmo volume de tampão de amostra, contendo 2-mercaptoetanol (2-ME) e fervidas em banho-maria por 5 minutos. O material foi aplicado em um gel de empilhamento de 5% e gel de resolução de 12% de poliacrilamida e submetido à eletroforese com corrente constante de 25 mA. O gel foi corado com azul de Coomassie R-250 e descorado com uma solução de 40% de ácido acético e 70% de etanol. Os padrões de peso molecular utilizados foi o PageRuler Unstained Protein7 Ladder (Thermo Scientific TM), compreendendo os seguintes valores de massa molecular: 25, 30, 40, 50, 60, 70, 85, 100, 120, 150 e 200 kDa.

3.3 Ensaio de Agregometria

Para a obtenção de PRP (plasma rico em plaquetas), aproximadamente 40 mL de sangue humano, obtido de doadores saudáveis (Protocolo do Comitê de Ética: 1251/CEPSH), foram colhidos em solução contendo 3,8% de citrato de sódio e centrifugados a 800 rpm por 30 minutos a 25 °C. O PRP corresponde à fração superior do tubo, foi colhido cuidadosamente. Para obtenção de plasma livre de plaquetas (PPP), utilizado como controle, 1 mL do PRP foi centrifugado a 14.000 rpm e o sobrenadante foi colhido cuidadosamente. O número de plaquetas foi contado em Câmara de Neubauer e ajustado entre 2 e 4.10⁸ células/mL. A agregação plaquetária foi determinada através de agregômetro (CHRONO-LOG) (Figura 12). O efeito da proteína recombinante GST-INS sobre a inibição de agregação plaquetária foi estudado através da incubação dessa (Figura 13), em diferentes concentrações, com PRP por 3 minutos a 37 °C, sob agitação, antes da adição de 10 µM de ADP (SIGMA-ALDRICH) por 3 minutos. A extensão da inibição da agregação foi estimada como a diminuição da porcentagem de transmissão de luz, tomando-se como 100% o valor obtido com a incubação do PRP com a solução diluente (PBS), apropriadamente usado como controle e desafiado posteriormente com ADP. A transmissão de luz foi monitorada através do agregômetro calibrado para 100% da transmitância com PPP e para 0% de transmitância com PRP.

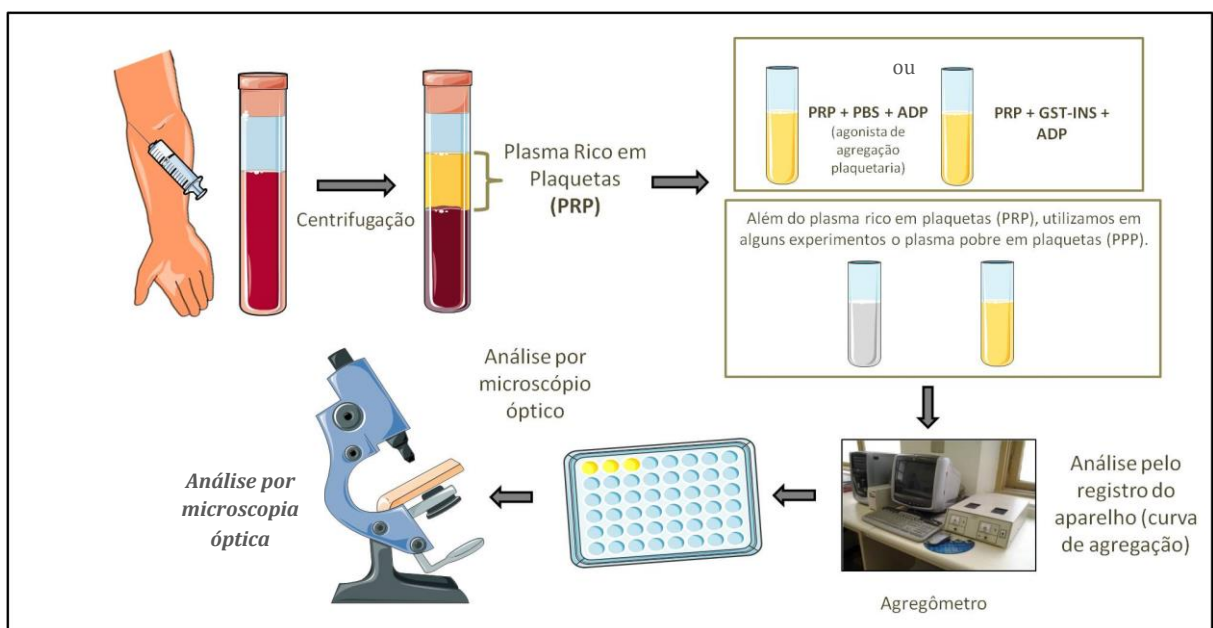
Figura 12 - Ensaio de agregação plaquetária (A) no agregômetro e seu registro experimental (B).



A: Plaquetas váveis (acima), deficientes ou tratadas com antagonistas plaquetários (abaixo) são desafiadas com agonistas, como ADP, trombina e ácido aracdônico, resultando diferentes curvas de registro; B: registro experimental de um ensaio no agregômetro utilizando plaquetas normais, indicando o início do experimento (1), após o desafio com um agonista ocorre uma alteração na morfologia da plaqueta com consequente secreção do conteúdo granular (2) e, por fim, a agregação plaquetária, quando há a adesão plaqueta/plaqueta (3).

Fonte: CASTRO et al., 2006

Figura 13 - Esquema representativo do ensaio de agregação plaquetária.



3.4 Ensaio de Citotoxicidade- MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)

A viabilidade celular foi quantificada pela atividade da succinato desidrogenase, uma enzima mitocondrial presente somente em células vivas de acordo com o protocolo descrito por Mosmann (1983). O substrato utilizado para esta enzima foi o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). As células L929 (fibroblasto murino) (1.10^4 células/orifício) foram adicionadas em placa de cultura com 96 poços e mantidas “overnight” em meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino (SFB) a 37 °C, atmosfera úmida e com 5% de CO₂. Após 24 horas, foi realizada lavagem com PBS estéril para remoção das células não aderidas. Em seguida adicionou-se diferentes concentrações da proteína recombinante GST-INS (4; 1,33; 0,44 e 0,15 μM), Triton ou meio RPMI por 1, 6 e 24 horas. Após os períodos de incubação, foram adicionados diretamente sobre o meio de cultura 10 μL de uma solução contendo 5 mg/mL de MTT e as células foram mantidas à 37 °C por 2 horas. Após este período, adicionou-se 100 μL de solução Isopropanol/HCl. A densidade óptica (DO) das amostras foi detectada em um comprimento de onda de 570 nm e os resultados expressos pelo valor da DO. A cultura foi feita em triplicada e o experimento repetido por três vezes.

3.5 Ensaio de Citotoxicidade- Exclusão por Azul de Tripan

A viabilidade celular também foi avaliada através do ensaio por exclusão do corante azul de tripan (0,4% em PBS) no qual células que absorvem o corante azul são consideradas viáveis. Sendo assim, as células foram adicionadas (5.10^4 células/orifício) em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação, os orifícios foram lavados com tampão PBS para remoção das células não aderidas. Antes da troca do meio contendo as diferentes concentrações da GST-INS, os orifícios representativos ao tempo zero foram fotografados para análise morfológica em microscópio óptico e tripsinizados para sua contagem com o corante Azul de Tripan. Nos demais

poços as células foram incubadas com a proteína por 6 e 24 horas e após essa etapa os orifícios foram fotografados e as células coletadas através de tripsinização. Foram adicionados 100 µL de meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino para neutralizar a ação da tripsina. Por fim, o conteúdo transferido para microtubos e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos. O número de células foi determinado por contagem das células em câmara de Neubauer, a partir de alíquotas de 10 µL procedentes da ressuspensão de 10 µL de meio de cultura e células em 40 µL de corante azul de tripan (fator de diluição 5). Cada experimento foi realizado em triplicata e a contagem das células foi feita em microscópio invertido de contraste de fase (LEICA) utilizando o aumento de 100x.

$$\text{Fator de diluição} = \frac{\text{vol. de Azul de Tripan} + \text{vol. de suspensão celular}}{\text{vol. da suspensão adicionado na câmara}} = \text{fator diluição utilizado}$$

A fórmula utilizada para a obtenção da porcentagem de viabilidade foi:

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células viáveis} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ de células vivas} + \text{n}^\circ \text{ de células mortas}} = \mathbf{x \% \text{ viabilidade}}$$

3.6 Obtenção de plaquetas lavadas

Para obtenção de plaquetas lavadas, o PRP foi centrifugado por 15 minutos a 2500 rpm. Depois de desprezado o sobrenadante, o sedimento plaquetário foi dissolvido em 10 mL de tampão de lavagem (818 mg NaCl, 84 mg NaHCO₃, 19mg KCl, 13 mg Na₂HPO₃, 20 mg MgCl₂, 646 mg Na₃Citrate, 10 mg glicose, 350 mg BSA, dissolvidos em 100 mL de H₂O, pH ajustado para 6,5 com HCl) e a mistura foi centrifugada 15 minutos a 2500 rpm. Por fim, após repetir a etapa anterior, novamente o sobrenadante foi desprezado e o sedimento redissolvido em 5 mL de tampão Tyrodes-Hepes (783 mg NaCl, 100 mg NaHCO₃, 22 mg KCl, 9 mg Na₂HPO₄, 20 mg MgCl₂, 14 mg CaCl₂, 238 mg HEPES e pH ajustado para 7,4 com HCl) contendo 1% de glicose. As

plaquetas foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas com solução Tyrodes para atingir a concentração de $3,8 \cdot 10^8$ /mL.

3.7 Linhagens Celulares

A linhagem de melanoma metastático humano utilizado neste trabalho foi a SK-MEL-28, gentilmente cedida pelo Dr. Durvanei Augusto Maria (Laboratório de Bioquímica e Biofísica) do Instituto Butantan. A linhagem celular L929 (ATCC) é um tipo celular aderente e oriundo do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos C3H/Na e o lote foi cedido pela Dra. Ruth Vassão (Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan). A linhagem HeLa derivada de carcinoma cervical humano foi gentilmente cedida pela Dra. Cecília Abe (Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan). Para nossos estudos também foi utilizada a linhagem t.End.1 de células endoteliais derivadas de timo murino, linhagem HUVEC/CRL-1730 (ATCC) oriunda de células endoteliais derivadas do endotélio de veia umbilical humana. As duas linhagens encontram-se disponíveis em nosso laboratório.

Tabela 1 - Listagem de células utilizadas nos experimentos e suas especificações.

Linhagem	Especificações Técnicas
SK-MEL-28	Célula de melanoma humano maligno. Apresenta mutações em PTEN, P53, N-RAS e BRAF. Expressa as integrinas $\alpha\beta3$, $\alpha6$, αv , $\beta1$, $\alpha2$ e $\beta3$ *.
HeLa	Carcinoma cervical humano. Expressa as integrinas $\alpha\beta5$, $\alpha1$, $\alpha2$, $\alpha6$, αv e $\beta1$ *.
L929	Fibroblasto oriundo da camada areolar do tecido subcutâneo de camundongo C3H/Na. Modelo escolhido para mimetizar células em condições fisiológicas normais.
t.End.1	Célula endotelial de timo murino. Mimetiza células de endotélio ativado. Utilizada em ensaios de angiogênese in vitro.
HUVEC/CRL 1730	Célula endotelial de veia umbilical humana. Expressa as integrinas $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha6$, αv , $\beta1$ e $\beta3$ *.

*Referência dos dados citados na tabela (TAKLEMARIAM et al., 2011; SEONE et al., 2010).

3.8 Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares

As células foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco®), com 10% de soro fetal bovino (Gibco®) inativado, 2 mM de L-glutamina (Gibco®) e antibiótico penicilina/estreptomicina (Gibco®). Já o meio de cultura das células HUVECs, excepcionalmente foi suplementado com 0,1 mg/mL de heparina e 0,05 mg/mL de suplemento de crescimento endotelial (ECGS). Os frascos de cultura foram mantidos na estufa contendo atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37 °C. Após confluência, as células foram subcultivadas para ampliação, congeladas em solução 10% dimetilsulfóxido (DMSO) em SFB e estocadas em nitrogênio líquido.

As suspensões celulares utilizadas para os ensaios foram obtidas após o tratamento dos frascos de cultura com Tripsina 0,2% (Gibco®) por 5 minutos e inativação com 10% de soro fetal bovino. As células desprendidas foram centrifugadas duas vezes, ressuspensas em meio de cultura e a concentração celular ajustada por contagem em câmara de Neubauer.

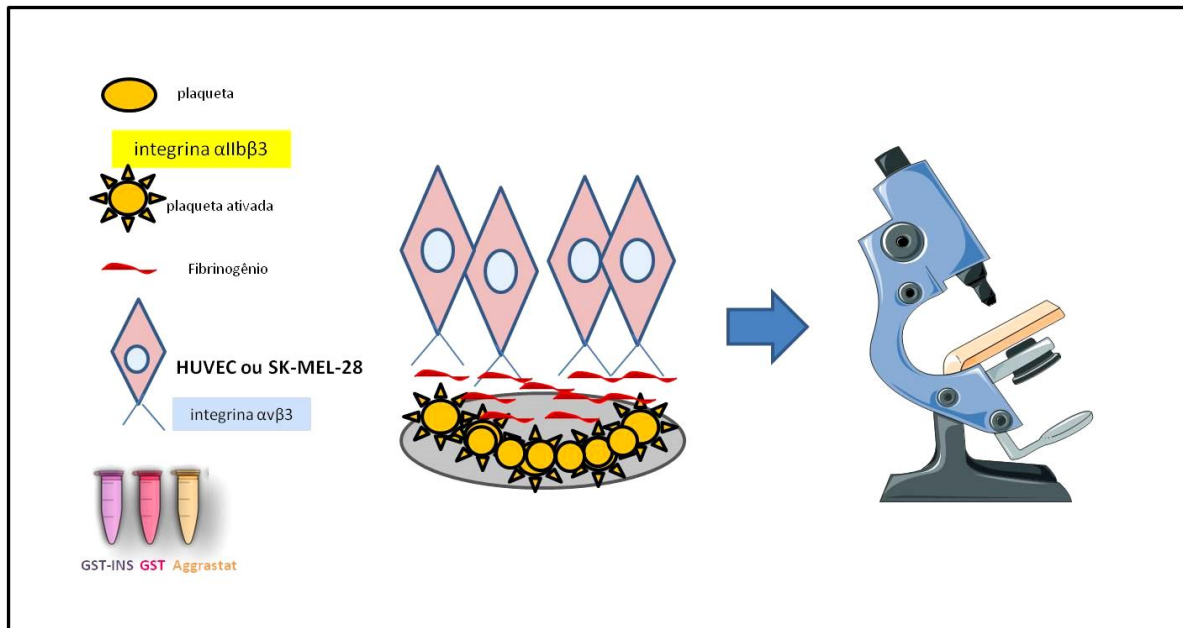
3.9 Ensaio de agregação plaquetária induzida pelas células tumorais (TCIPA)

Para nosso modelo experimental de TCIPA, utilizamos as células de melanoma da linhagem SK-MEL-28. As interações entre plaquetas e células tumorais foram determinadas através de agregômetro (CHRONO-LOG). Quatrocentos microlitros de PRP, contendo plaquetas ($2 \cdot 10^8$ células/mL) foram incubadas por 3 minutos a 37 °C, sob agitação, antes da adição de células tumorais. A TCIPA foi iniciada pela adição de 100 µL de células tumorais ($5 \cdot 10^6$ células/mL) previamente incubadas ou não com doses crescentes da proteína recombinante GST-INS ou Aggrastat® (Cloridrato de tirofiban, um antagonista não peptídico seletivo para receptor GPIIb/IIIa-integrina α IIb β 3, utilizado na clínica médica para prevenção de eventos cardíacos isquêmicos). As reações foram monitoradas e analisadas utilizando agregômetro por 10 minutos. Essa metodologia foi desenvolvida segundo o protocolo descrito por Lian et al., (2013).

3.10 Ensaio de Adesão Celular (HUVEC, SK-MEL-28 ou L929) às plaquetas, em condições estáticas

Esse ensaio foi realizado de acordo com o descrito por Lonsdorf et al., (2012), com algumas modificações, onde uma suspensão de plaquetas (3.10^8 células/mL) lavadas foram ressuspendidas em aproximadamente 3 mL de tampão Tyrodes-Hepes. Cem microlitros dessa suspensão foram utilizados para revestir placas de cultura de 96 orifícios. As placas foram mantidas a 37 °C por 1 hora. As plaquetas não aderidas foram removidas através de lavagem com tampão Tyrodes-Hepes, respectivamente. Foram adicionados 20 µL de trombina por 10 minutos e novamente três lavagens foram realizadas com tampão Tyrodes-Hepes. Após as lavagens, as plaquetas foram incubadas com solução de bloqueio contendo 1% de BSA em PBS por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionada a suspensão de 1.10^5 células/orifício (HUVECs, SK-MEL-28 ou L929) previamente incubadas com doses crescentes da proteína recombinante GST-INS, GST ou Aggrastat®. Como controle, foi utilizada a suspensão de células previamente incubada com meio RPMI. As células foram incubadas por 2 horas a 37 °C. A placa foi lavada por três vezes com tampão Tyrodes-Hepes para retirada das células não aderidas. As células foram fixadas e coradas com o kit Hema 3 (Fisher HealthCare PROTOCOL). Cada experimento foi realizado em triplicata, repetidos por 4 vezes e a contagem das células foi feita em microscópio invertido de contraste de fase (LEICA) utilizando o aumento de 100x.

Figura 14 - Esquema representativo do ensaio de adesão celular *in vitro*.

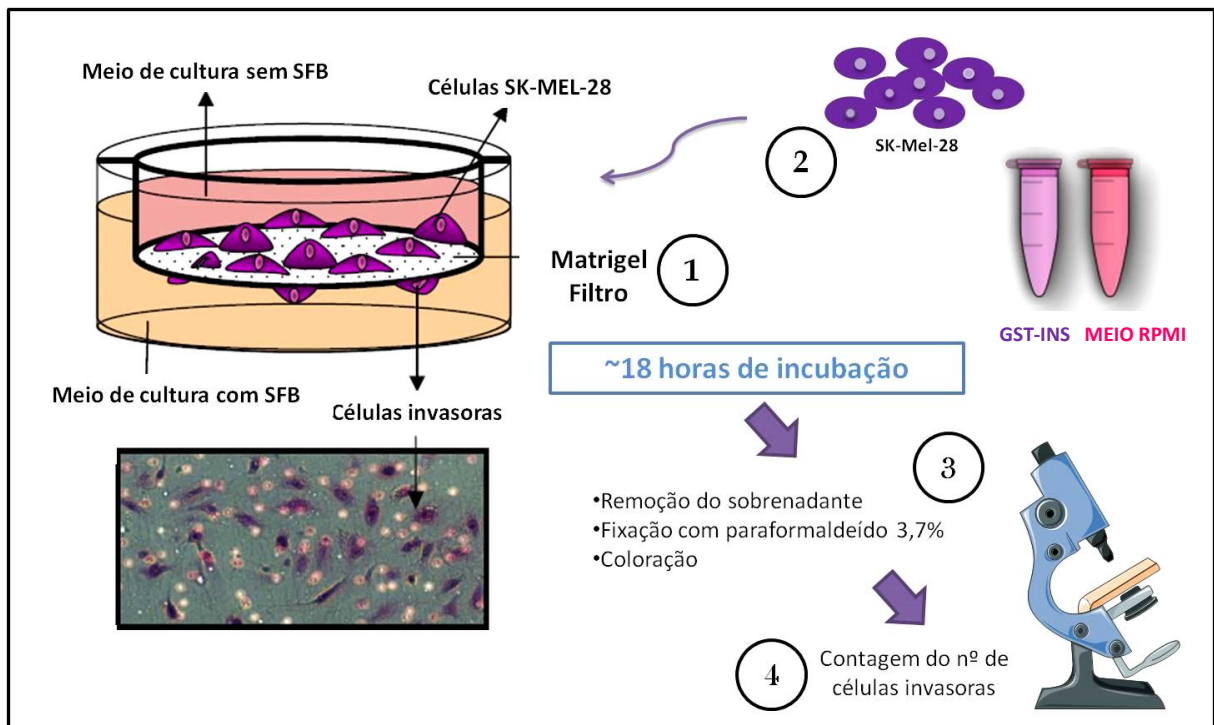


3.11 Ensaio de Invasão Celular

Esse protocolo foi realizado de acordo com o descrito por Yang et al., (2005), com algumas adaptações. Para o ensaio de invasão utilizamos o sistema do tipo Transwell (*Millicell Cell Culture Inserts*, Millipore®), onde a câmara inferior é constituída por uma placa com 24 orifícios e a câmara superior por um filtro de polycarbonato com poros de 8 μm . A membrana foi hidratada em RPMI com soro fetal bovino por 15 minutos a 37 °C e posteriormente revestida com 250 μL de Matrigel (Hidrogel constituído de matriz extracelular, Corning® Matrigel Matrix) em uma concentração final de 1 mg/mL. Para gelificação do substrato a placa de cultura foi mantida a 37 °C por 30 minutos. Células SK-MEL-28 foram tripsinizadas e ressuspensas em um número de $5 \cdot 10^4$ células/orifício em RPMI sem soro fetal bovino. Em seguida, as células foram incubadas com a insularina ou meio RPMI por 15 minutos, sob agitação. Na câmara inferior 600 μL de RPMI foram adicionados contendo soro fetal bovino (quimioatrativo para as células). Posteriormente, 300 μL das células incubadas com as proteínas foram adicionadas à câmara superior. As células foram incubadas por 24 horas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 . Após o período de

incubação, a câmara superior de invasão foi delicadamente invertida para remoção do sobrenadante e as células que não invadiram o substrato foram removidas utilizando um cotonete. As células que digeriram o Matrigel e migraram para a face inferior da membrana foram fixadas com paraformaldeído 3,7% em PBS e coradas com solução de Cristal Violeta 2% em metanol. Cada experimento foi realizado em triplicata, repetidos por 4 vezes e a contagem das células invasoras foi realizada utilizando microscópio invertido de contraste de fase (LEICA) no aumento de 100x.

Figura 15 - Esquema representativo do ensaio de invasão celular *in vitro*

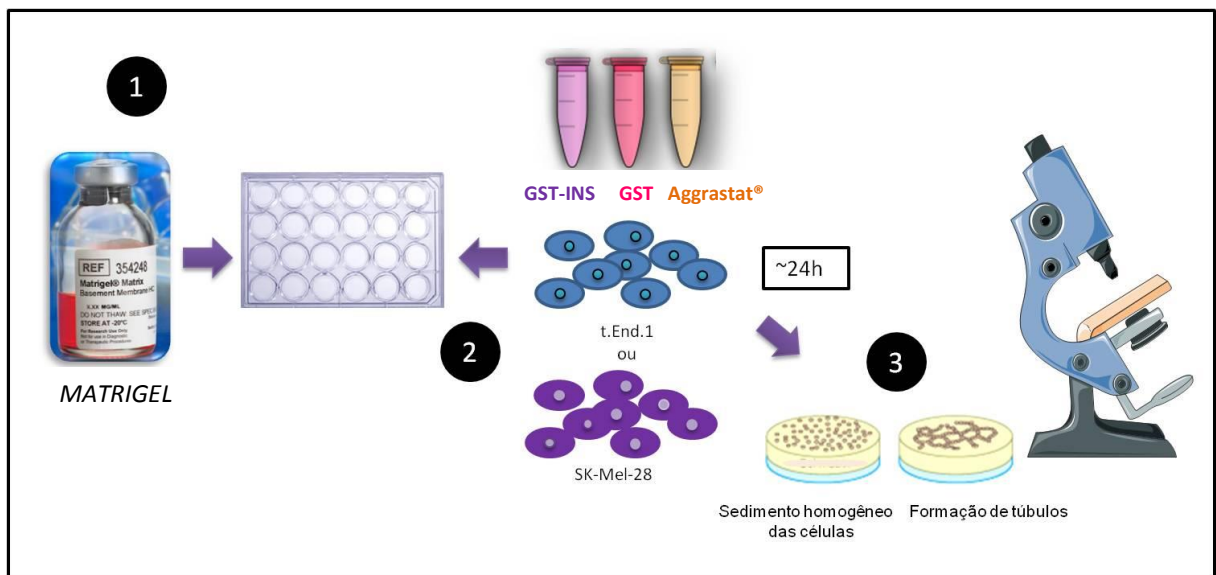


3.12 Ensaio de formação de túbulos *in vitro* por células endoteliais ou por melanoma humano

Esse protocolo foi realizado de acordo com o descrito por Rufinni et al., (2015), com algumas adaptações. Para análise da formação de estruturas tubulares em Matrigel, a matriz foi descongelada a 4 °C e diluída (1:3) em meio RPMI 1640 sem soro fetal bovino. Foram adicionados 100 µL do matrigel diluído em placas de cultura com 24 orifícios e em seguida a placa foi mantida por 30 minutos a 37 °C, para solidificação do substrato. Células

endoteliais t.End.1 (1.10^6 células/orifício) ou células de melanoma SK-MEL-28 (5.10^4 células/orifício) foram pré-incubadas com GST-INS, GST, Aggrastat® ou RPMI por 15 minutos e adicionadas ao matrigel. As células foram incubadas por 24 horas, a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após esse período, os poços foram lavados com PBS para a remoção das células não aderidas, as placas foram fixadas com 4% de paraformaldeído e fotografadas em microscópio invertido de contraste de fase (LEICA).

Figura 16 - Esquema representativo do ensaio de formação de túbulos *in vitro*.

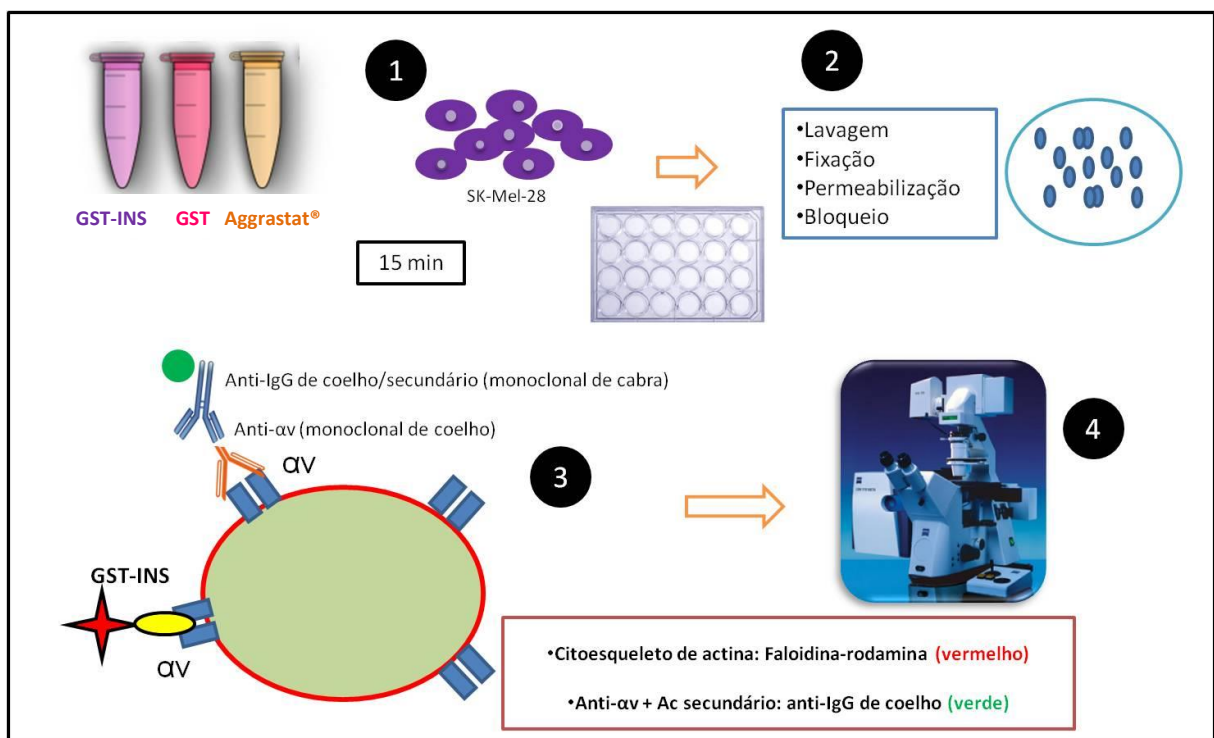


3.13 Ensaio de imunofluorescência (Microscopia Confocal)

Para reação de imunofluorescência, foram utilizadas células SK-MEL-28 (5.10^4 /orifício) previamente tratadas ou não com a GST-INS, GST ou Aggrastat por 15 minutos. Após o término do tratamento, as células foram lavadas com PBS, fixadas e permeabilizadas em tampão PHEM/Triton-X 0,5%, sacarose 5% e paraformaldeído 4%, por 5 minutos, para promover a exposição dos sítios antigênicos que serão reconhecidos pelo anticorpo. Os discos foram lavados em PHEM e glicina (1x) e fixados em paraformaldeído 4%, sacarose 5%, por um período de 20 minutos. As lamínulas foram lavadas novamente em PHEM e glicina (três vezes a cada 10 minutos) e então foram bloqueadas com NGS (*natural goatserum*) diluído em PHEM e

glicina (1:1) durante 1 hora a temperatura ambiente. Após este período, as lamínulas foram incubadas na presença de anticorpos monoclonais de coelho anti- α v (diluição 1:500, diluído em 1:100 de soro de cabra em PHEM e glicina), e mantidos overnight a temperatura ambiente. Após o período de incubação as lamínulas foram lavadas com PHEM e glicina três vezes por 10 minutos e incubadas com anticorpo secundário de cabra anti-coelho (A11008488, diluído 1:2000 em tampão de bloqueio) juntamente com faloidina conjugada com rodamina (Molecular Probes, diluído 1:200 em tampão de bloqueio) por período de 1 hora a temperatura ambiente e ausência de luz. As lamínulas foram lavadas três vezes com PHEM e glicina por período de 10 minutos por lavagem. A montagem da lâmina foi feita com Vectashield e observadas a 400x no microscópio confocal (Zeiss) do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan.

Figura 17 - Esquema representativo do ensaio de imunofluorescência.



3.14 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para o ensaio de microscopia eletrônica de varredura, foram utilizadas placas de cultura com 24 orifícios. Plaquetas lavadas foram previamente tratadas ou não com a GST-INS, GST ou Aggrastat®, na concentração de 2 μM , por 15 minutos. Após o término do tratamento, as plaquetas foram ressuspendidas juntamente às células SK-MEL-28 e transferidas para a placa de cultura (100 μL de células a $0,5 \cdot 10^6$ + 200 μL de plaqueta lavada a $3 \cdot 10^8$ células/mL na presença da proteína) totalizando 300 μL por orifício contendo lamínula. A placa foi mantida em cultura por 2 horas a 37 °C. Após o período de incubação foram feitas lavagens com tampão PBS e a fixação foi realizada utilizando a solução de Karnovsky por 3 horas. Posteriormente foi realizada 3 lavagens com cacodilato de sódio 0,1M (pH=7,2), com pausas de 5 minutos e impregnação com tampão cacodilato de sódio 0,2M com 1% de ósmio por 30 minutos. Novas lavagens com tampão cacodilato de sódio foram feitas e uma série crescente de desidratação etanólica (álcool 30%, 50%, 70%, 95% e 100% 2 lavagens cada com 15 minutos de pausa). A secagem foi realizada através do método de ponto crítico, utilizando Dióxido de Carbono (CO_2) como fluido de transição. Por fim, foi feita a montagem do material e o banho de ouro por sistema *sputtering*. O material foi observado no Microscópio Eletrônico de Varredura (FEI Quanta 250) do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

3.15 Análises Estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software computacional Graphpad Prism, da companhia Graphpad Software Incorporation, versão 5.0. Para os ensaios de viabilidade e adesão celular o teste usado foi o ANOVA, seguido pelo teste Tukey. Para alguns experimentos, utilizou-se o t teste. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

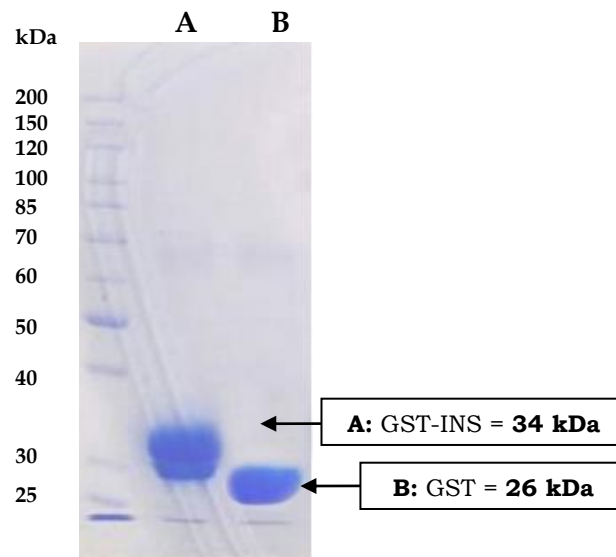
4.1 Quantificação das proteínas recombinantes GST-INS e GST (proteína controle)

A quantificação das proteínas recombinantes foi realizada por análise em espectrofotômetro mediante leitura da absorbância a 280 nm, resultando em aproximadamente 5 mg de GST-INS e 7,5 mg de GST a partir de 200 mL de cultura bacteriana inicial.

4.2 Análise da expressão da GST-INS por SDS-PAGE

A fim de verificarmos a expressão da GST-INS e GST, bem como suas condições de pureza, realizamos um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Figura 18).

Figura 18 - Gel de poliacrilamida da proteína GST-INS.



Amostras contendo 5 µg de GST-INS ou GST (proteína utilizada como controle) foram submetidas à eletroforese por SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 12%, em condições redutoras, contendo tampão de amostra com 2-mercaptoetanol) e as bandas resultantes foram coradas com Coomassie Blue R-250. (A) Insularina recombinante (GST-INS). (B) Proteína Controle- (GST). Os números referentes às massas moleculares das proteínas utilizadas como marcadores estão indicadas à esquerda.

A proteína GST-INS apresentou banda com massa molecular de aproximadamente 34 kDa (Figura 18A), compatível com o descrito na

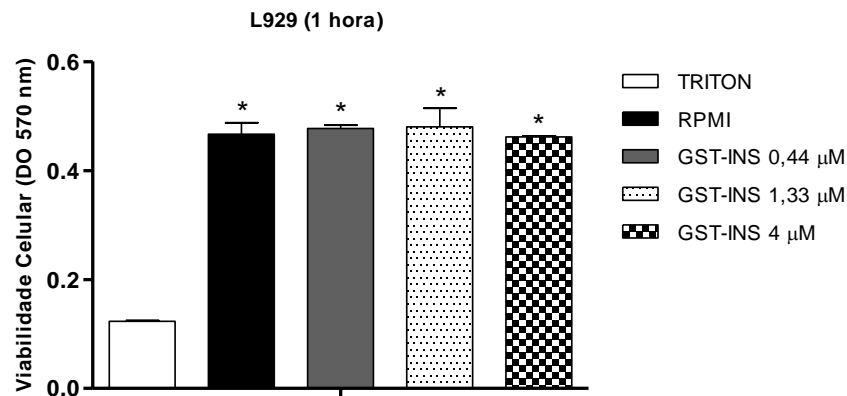
literatura (26 kDa para a GST + 8 kDa para insularina). A proteína GST, utilizada como controle, apresentou massa molecular de 26 kDa (Figura 18B). Ambas podem ser visualizadas em ótimas condições de pureza, indicando sucesso no desenvolvimento dos protocolos de expressão e de purificação.

4.3 Análise do efeito da proteína GST-INS na viabilidade celular de fibroblastos (L929) através de ensaio por MTT

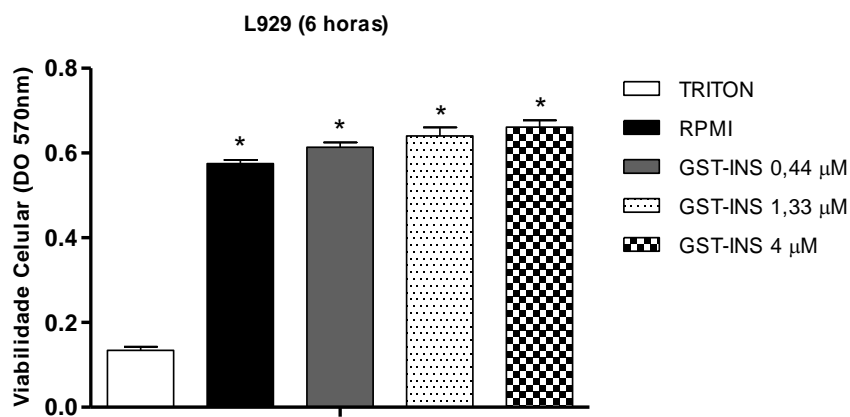
Considerando que a proteína GST-INS estava com expressão e grau de pureza satisfatório e manutenção da atividade biológica frente às plaquetas, antes de iniciarmos nossos estudos com células tumorais, optamos por avaliar a ação da GST-INS em células em condições fisiológicas normais. Para isso, realizamos ensaios de viabilidade por MTT utilizando a linhagem de fibroblastos (L929). Nesse ensaio, após as células atingirem confluência (período de 18 horas) adicionou-se GST-INS em diferentes doses (4; 1,33; 0,44 e 0,15 μM) e períodos (1, 6 e 24 horas).

A análise quantitativa demonstrou que a GST-INS não comprometeu a viabilidade das células L929 em praticamente todas as doses utilizadas e nos períodos de 1, 6 e 24 horas (Figuras 19A, B e C). A proteína apresentou apenas efeito tóxico quando utilizada na maior dose (4 μM) no tempo de 24 horas (Figura 19C).

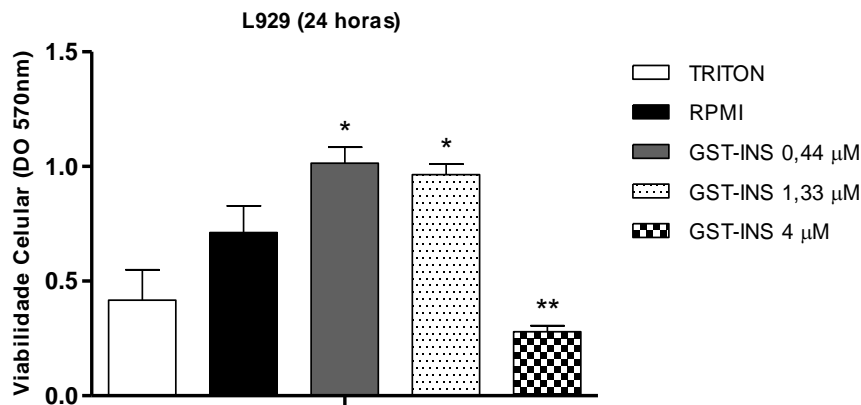
Figura 19 - Viabilidade Celular de L929 tratadas com GST-INS.



(A) Células L929 foram incubadas com a proteína em diferentes concentrações por 1 hora e a viabilidade foi avaliada por MTT. Células incubadas com meio RPMI ou Triton (1%) foram utilizadas como controle. Os resultados obtidos foram expressos como média da intensidade de absorvância \pm DP das células das amostras em triplicatas. * $p < 0,05$ - células tratadas com RPMI e GST-INS nas diferentes doses em relação ao controle com Triton.



(B) Células L929 foram incubadas com a proteína em diferentes concentrações por 6 horas e a viabilidade foi avaliada por MTT. Células incubadas com meio RPMI ou Triton (1%) foram utilizadas como controle. Os resultados obtidos foram expressos como média da intensidade de absorvância \pm DP das células das amostras em triplicatas. * $p < 0,05$ - células tratadas com RPMI e GST-INS nas diferentes doses em relação ao controle com Triton.



(C) Células L929 foram incubadas com a proteína em diferentes concentrações por 24 horas e a viabilidade foi avaliada por MTT. Células incubadas com meio RPMI ou Triton (1%) foram utilizadas como controle. Os resultados obtidos foram expressos como média da intensidade de absorvância \pm DP das células das amostras em triplicatas. * $p < 0,05$ - células tratadas com GST-INS nas doses de 0,44 μM e 1,33 μM em relação ao controle com Triton. ** $p < 0,05$ - células tratadas GST-INS 4 μM em relação ao controle com RPMI.

4.4 Análise do efeito da proteína GST-INS na viabilidade celular de fibroblastos (L929) através de ensaio por exclusão de Azul de Tripán

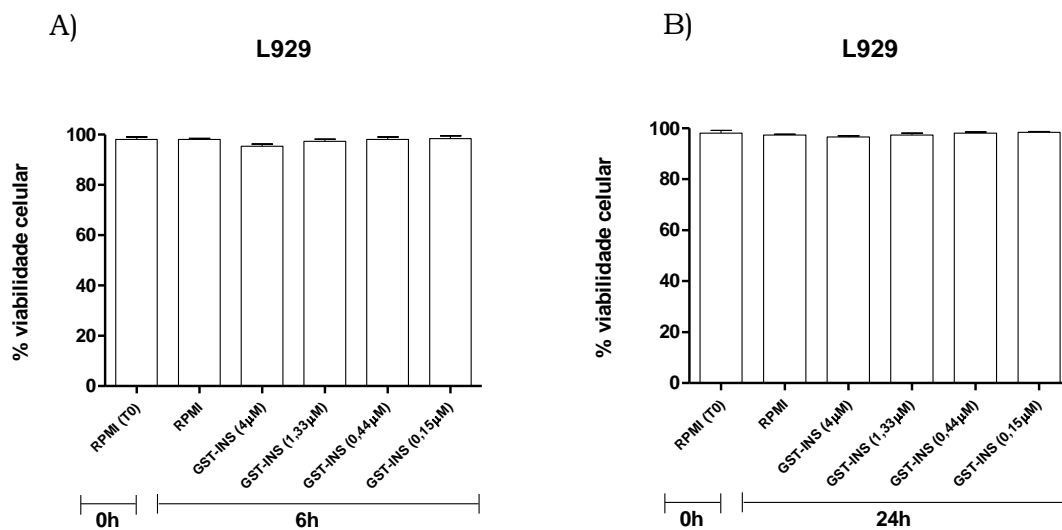
Para confirmar o resultado obtido através do ensaio de viabilidade por MTT, optamos por avaliar também o efeito da GST-INS em fibroblastos (L929) através do ensaio por exclusão de azul de tripan.

Semelhantemente ao ensaio anterior, após os fibroblastos atingirem confluência (período de 18 horas) adicionou-se GST-INS em diferentes doses (4; 1,33; 0,44 e 0,15 μM) e períodos (6 e 24 horas).

Nossos resultados demonstraram que a GST-INS não comprometeu a viabilidade dos fibroblastos em todas as doses e períodos de incubação (Figuras 20A e B). A GST-INS não apresentou efeito citotóxico em fibroblastos mesmo quando utilizada na maior dose (4 μM) e no tempo de 24 horas. A análise qualitativa por microscopia óptica demonstrou que mesmo em doses altas, as células mantiveram-se confluentes e espalhadas (Figura 21A e B).

Já na dose de 4 μ M observamos que as células estão menos aderentes e com a morfologia arredondada, porém sem sinais relevantes de comprometimento na estrutura da membrana celular.

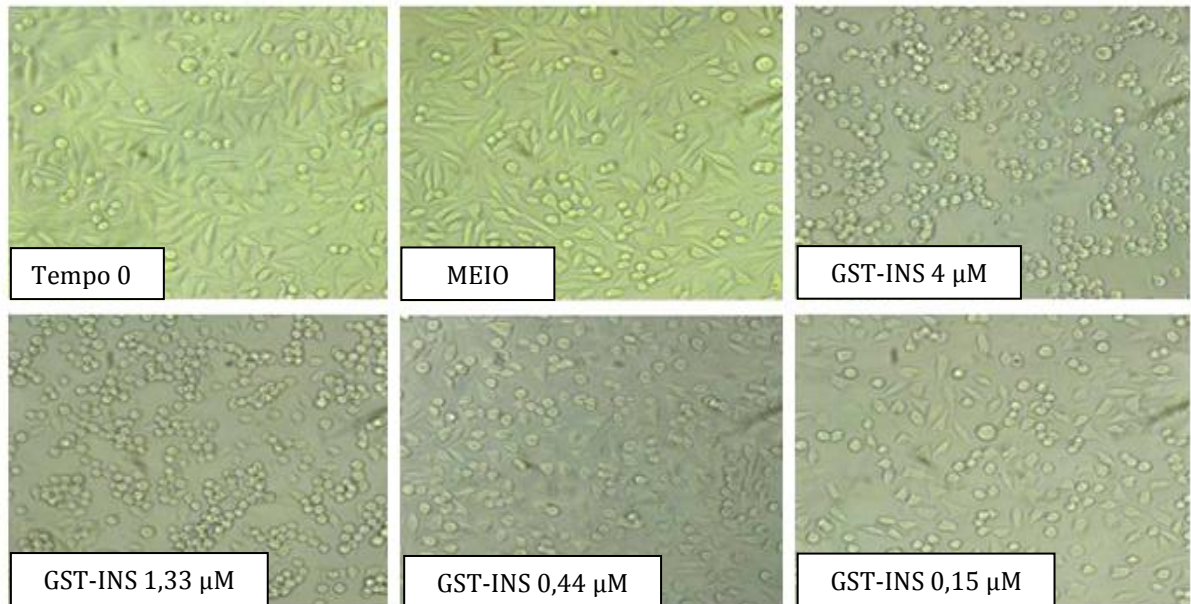
Figura 20 – Análise da citotoxicidade por Exclusão de Azul de Tripán em fibroblastos (L929) tratados com GST-INS.



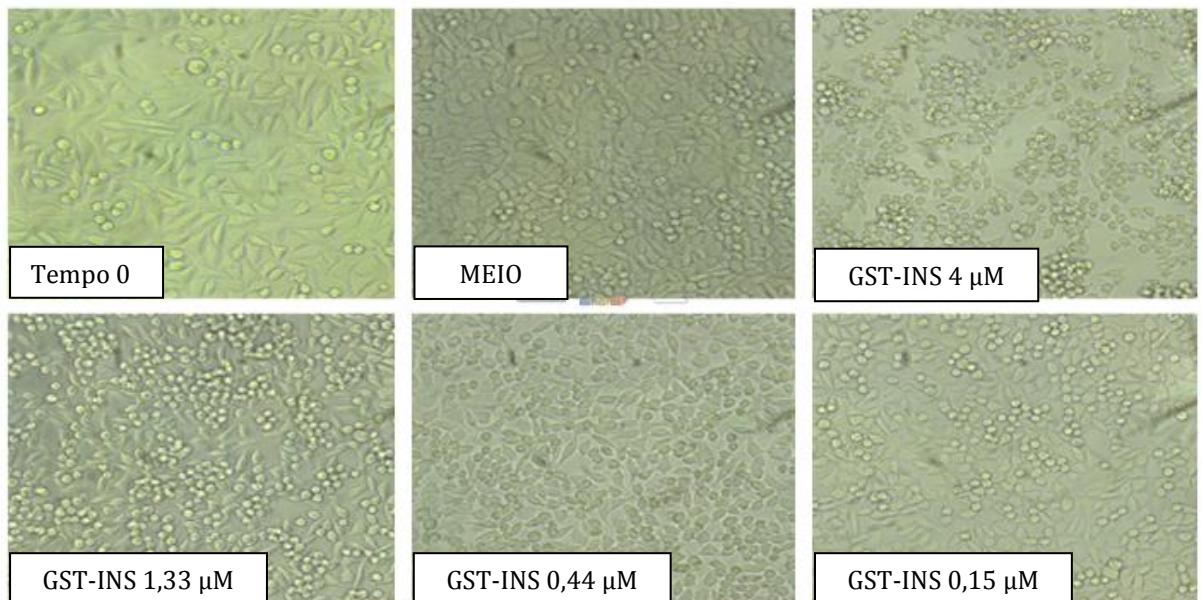
Células L929 foram incubadas com a proteína em diferentes concentrações por 6 horas (A) e 24 horas (B) e a viabilidade foi avaliada por Exclusão de Azul de Tripán. Células incubadas com meio RPMI foram utilizadas como controle. Os resultados obtidos foram expressos como média da porcentagem de células viáveis (dados obtidos através da contagem do número de células coradas e não coradas) \pm DP das células das amostras em triplicatas. Em ambos os períodos de incubação, 6 horas (A) e 24 horas (B), não houve diferença estatística das amostras com GST-INS (todas as concentrações utilizadas) em relação ao controle com RPMI e ao tempo zero de incubação das células.

Figura 21 – Microscopia de contraste de fase de fibroblastos (L929) tratados com GST-INS.

A)



B)



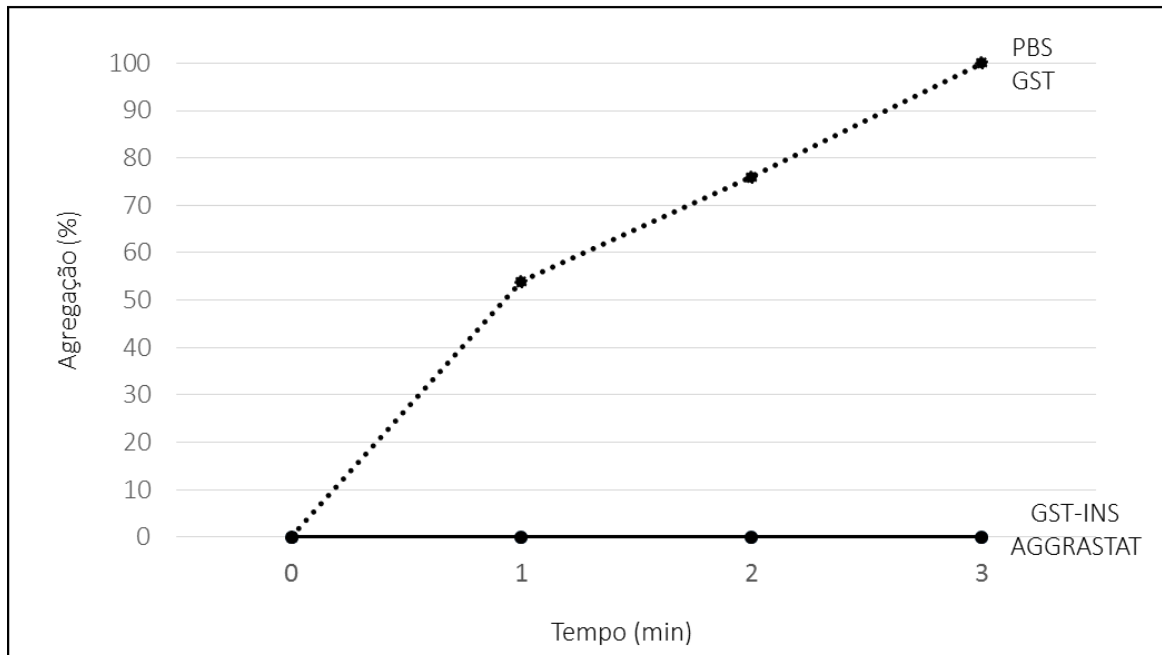
Microscopia das amostras foi realizada após os períodos de incubação dos fibroblastos (L929) com a GST-INS nos períodos de 6 horas (A) e 24 horas (B). É possível notar a presença de fibroblastos aderidos no tempo 0 e no controle com meio, assim como nas amostras tratadas com a GST-INS nas diferentes concentrações e períodos de incubação. Nas imagens referentes à amostra GST-INS na dose de 4 μM (A e B), nota-se que os fibroblastos estão menos aderentes, porém sem alterações morfológicas que indiquem morte celular. As amostras foram fotografadas no aumento de 200x.

4.5 Avaliação da proteína GST-INS na inibição da agregação plaquetária *in vitro*

Sabendo-se que, classicamente, as disintegrinas RGD inibem a agregação plaquetária, o próximo passo foi verificar a atividade da GST-INS na agregação plaquetária induzida pelo agonista ADP, utilizando agregômetro. Nossos resultados demonstraram que a GST-INS inibiu a agregação plaquetária de forma significativa (Figura 22).

A proteína recombinante na concentração de 13 μM foi eficaz na inibição da agregação plaquetária induzida por ADP demonstrando inibição de 100% da agregação plaquetária quando comparada ao controle PBS e GST (Figura 22). Como controle de inibição da agregação, utilizou-se o Aggrastat®.

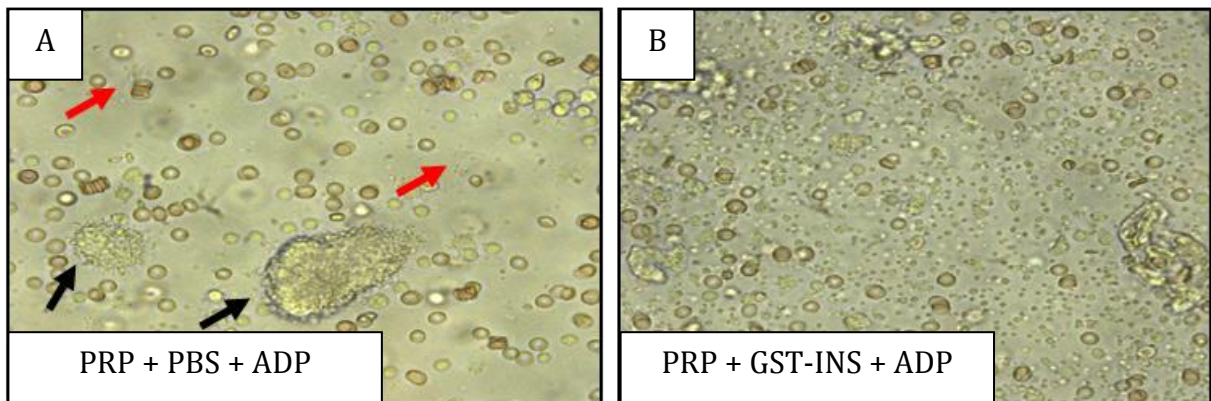
Figura 22 - Avaliação da ação da proteína GST-INS na inibição da agregação plaquetária.



400 μ L de PRP foram incubados durante 3 minutos a 37°C com 90 μ L do controle PBS. Após esse período foram adicionados 10 μ L de ADP. A proteína GST-INS ou GST (13 μ M) na quantidade de 90 μ L também foi incubada com 400 μ L PRP a 37°C por 3 minutos seguida da adição de 10 μ L de ADP. Como controle de inibição, utilizou-se a droga AgGrastat®. Os resultados foram obtidos através das curvas de agregação plaquetária registradas pelo Agregômetro.

Após o ensaio em agregômetro, realizamos a microscopia das amostras controle (PBS) e experimental (GST-INS). Com a observação em microscópio de contraste de fase notamos a presença de agregados plaquetários na amostra controle contendo o PRP incubado com PBS e posteriormente desafiado com ADP (Figura 23A). Já a amostra contendo PRP incubado com GST-INS e posteriormente desafiada com ADP, não apresentou agregados plaquetários (Figura 23B) comprovando a ação anti-agregante desta proteína.

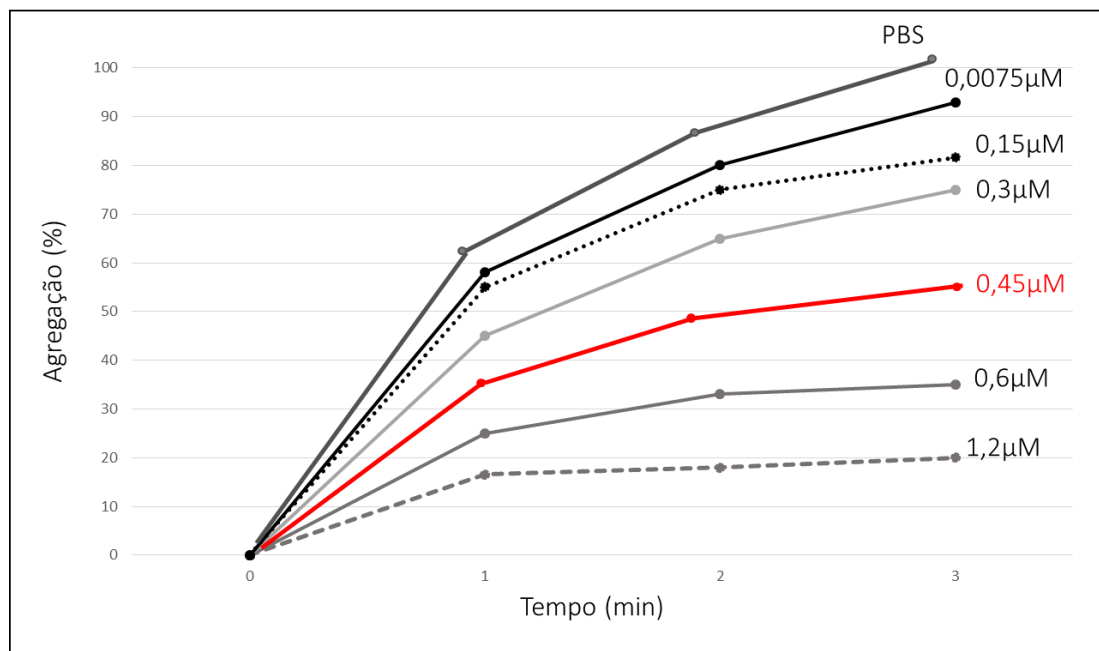
Figura 23 - Microscopia de contraste de fase das amostras utilizadas no agregômetro.



As amostras avaliadas no agregômetro foram imediatamente transferidas para uma placa de 48 poços e observadas em microscópio de contraste de fase. (A) Presença de agregados plaquetários (setas pretas) com a existência de hemácias (setas vermelhas) e poucas plaquetas ao fundo. (B) Ausência de agregados plaquetários com a presença de hemácias e plaquetas soltas ao fundo. Aum. 400x.

A próxima etapa foi determinar qual a dose da GST-INS capaz de inibir 50% da agregação plaquetária induzida por ADP (IC₅₀) (Figura 24).

Figura 24 - Avaliação da ação da proteína GST-INS na inibição da agregação plaquetária dependente de ADP.



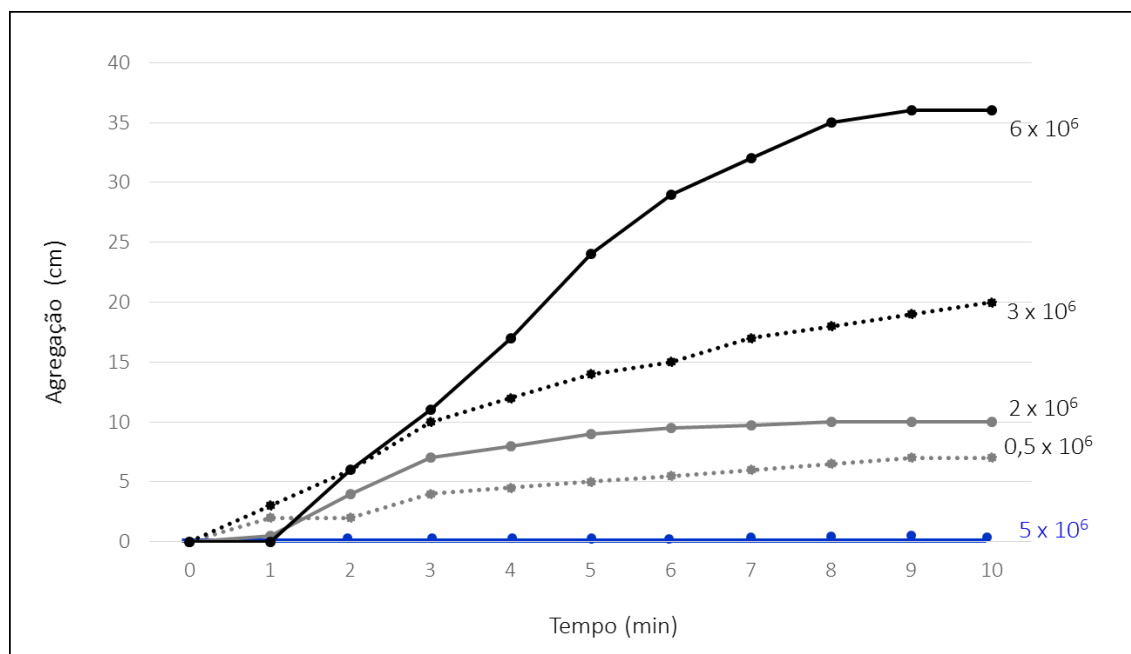
400 μ L de PRP, que foi incubado por 3 minutos com a proteína GST-INS nas concentrações de 0,0075 μ M; 0,15 μ M; 0,3 μ M, 0,45 μ M, 0,6 e 1,2 μ M. Após esse período foram adicionados 10 μ L de ADP (10 μ M). O gráfico apresenta a porcentagem de agregação de acordo com cada dose utilizada. Os resultados foram obtidos através da curva de agregação plaquetária registrada pelo Agregômetro.

Durante os ensaios de agregação foram utilizadas doses crescentes da proteína GST-INS. O IC50 foi estabelecido como 0,45 μM pela ferramenta *GraphPadPrism*, que determinou o valor matemático aproximado para essa proteína de acordo com os resultados obtidos durante o teste de inibição.

4.6 Avaliação da agregação plaquetária induzida por células tumorais (TCIPA) SK-MEL-28 ou HeLa

Realizamos testes iniciais para avaliar o potencial de SK-MEL-28 na indução da agregação plaquetária e utilizamos outra linhagem tumoral HeLa (0,5 – 5.10⁶ células/mL) a fim de se estabelecer um estudo comparativo com células de melanoma (Figura 25).

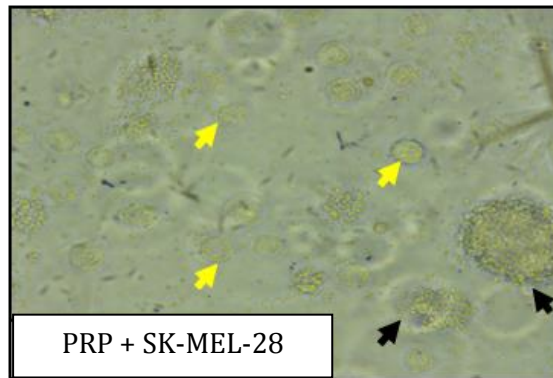
Figura 25 - Indução da agregação plaquetária por células SK-MEL-28.



400 μL de PRP foram incubados com 100 μL de células SK-MEL-28 em diferentes concentrações de 0,5.10⁶; 2.10⁶; 3.10⁶ e 6.10⁶ por mL. Verificou-se que as células SK-MEL-28 foram capazes de induzir significativamente a agregação plaquetária. Entretanto, quando se utilizou células HeLa não se detectou agregação plaquetária, mesmo quando essas células foram utilizadas nas maiores concentrações celulares (5.10⁶ células/mL). A linha azul representa a curva gerada pela incubação com células HeLa. O gráfico representa as curvas de agregação plaquetária registrada pelo agregômetro.

A análise microscópica permitiu a visualização de agregados plaquetários quando o PRP foi incubado com células SK-MEL-28 (Figura 26).

Figura 26 - Microscopia de contraste de fase; indução da agregação plaquetária por células tumorais SK-MEL-28.

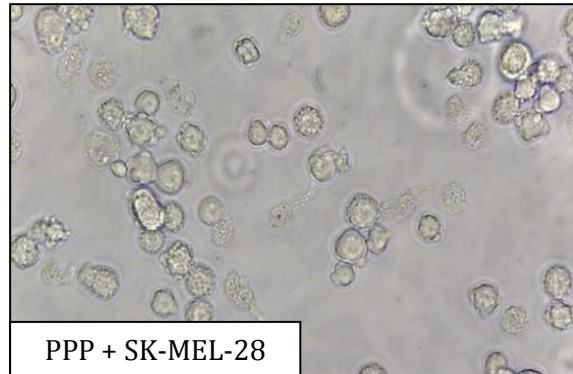


As amostras analisadas em agregômetro foram imediatamente transferidas para uma placa de 48 poços e observadas em microscópio. Aum. 400 x. Presença de agregados (setas pretas) e células tumorais soltas (setas amarelas).

Após avaliação do potencial das células tumorais em induzir agregação plaquetária e padronização da concentração mais adequada de células para os próximos ensaios, realizamos testes com PPP a fim de verificar se somente o fato das células SK-MEL-28 estarem na presença de proteínas do plasma (na ausência de plaquetas) poderiam agregar-se umas às outras de forma espontânea.

Pela análise em agregômetro não se detectou nenhuma curva correspondente à agregação celular. Corroborando com esse resultado, em análise microscópica visualizou-se células tumorais soltas, sem evidências de agregados (Figura 27).

Figura 27 - Microscopia de contraste de fase nas amostras de células tumorais com plaquetas PPP.



Análise microscópica da amostra contendo células SK-MEL-28 ($5 \cdot 10^6$ células/mL) incubadas por 10 minutos na presença de PPP. Aum. 400 x.

Inicialmente imaginávamos que o fato das células SK-MEL-28 expressarem em abundância integrinas $\alpha\beta_3$ poderia desencadear a formação de agregados de células tumorais na presença apenas de proteínas plasmáticas, no entanto, com os resultados obtidos verificamos a necessidade da interação entre plaquetas, células tumorais e proteínas plasmáticas para a TCIPA.

4.7 Avaliação da GST-INS ou GST na inibição da agregação plaquetária induzida por células SK-MEL-28

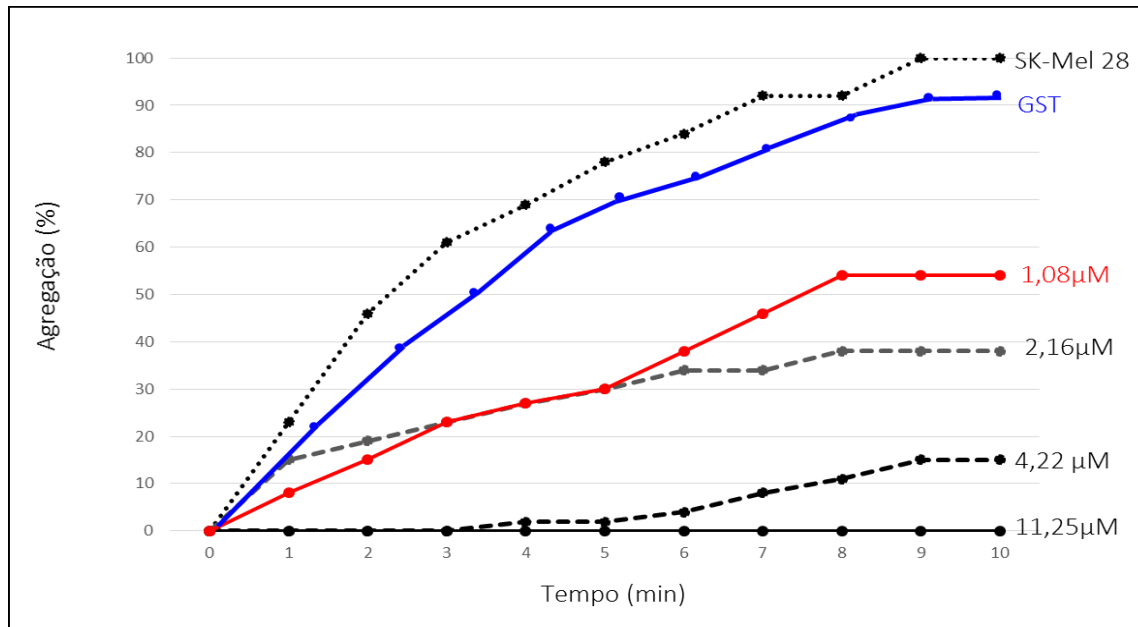
Sabendo que muitos tumores induzem agregação plaquetária (TCIPA), fomos verificar a ação inibitória da GST-INS nesse fenômeno utilizando SK-MEL-28 na presença de PRP. Utilizamos diversas concentrações da proteína a fim de encontrar seu IC50 na inibição da TCIPA. Nesses testes, a proteína GST foi utilizada como controle.

A proteína GST-INS inibiu significativamente a agregação plaquetária induzida por células SK-MEL-28 e de forma dose-dependente, apresentando um IC50 correspondente a $1,08 \mu\text{M}$ (Figura 28).

A proteína GST não apresentou potencial de inibição sobre a TCIPA, demonstrando que a inibição ocorre exclusivamente pela ação da porção insularina (INS) (Figura 28). A amostra de GST-INS na concentração de $1,08$

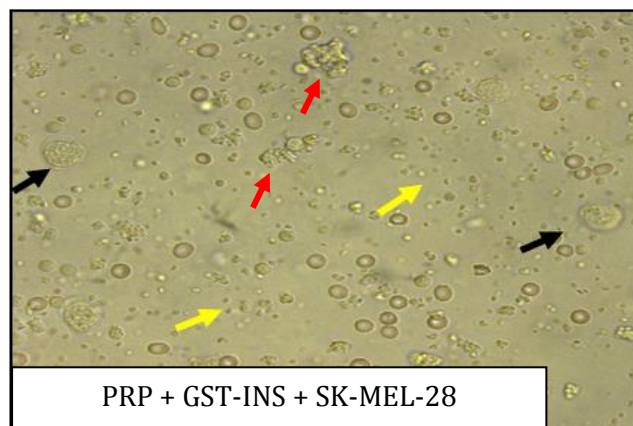
μM incubada com as células SK-MEL-28 foi visualizada em microscópio de contraste de fase (Figura 29).

Figura 28 - Avaliação da ação da proteína GST-INS na inibição da agregação plaquetária induzida por SK-MEL-28 em diferentes concentrações.



400 μL de PRP foram incubados por 3 minutos a 37°C com a proteína GST-INS ou GST utilizada como controle (linha azul), após esse período foram adicionadas as células tumorais na concentração de $5 \cdot 10^6$ células/ mL e incubadas por 10 minutos. O gráfico representa curvas de agregação plaquetária registrada pelo Agregômetro.

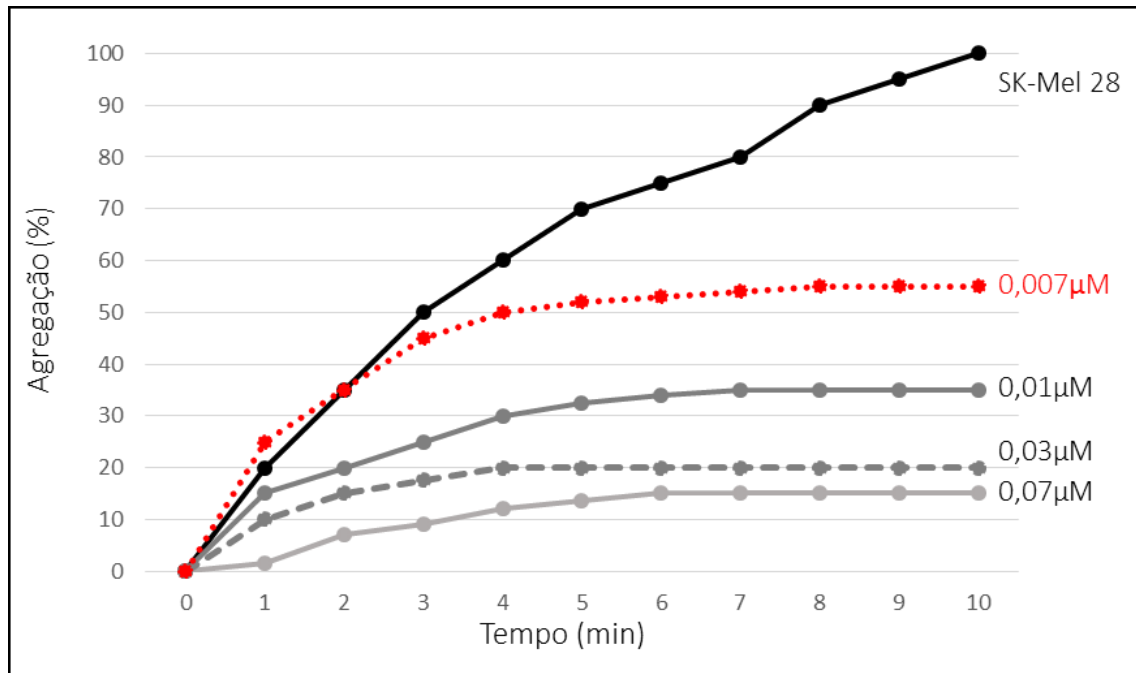
Figura 29 - Microscopia de contraste de fase da amostra de GST-INS.



Microscopia das amostras foi realizada após teste em agregômetro. As amostras foram transferidas, imediatamente, para uma placa de 48 poços e analisadas. É possível notar a presença de células tumorais soltas (setas amarelas), plaquetas homogêneas no campo (setas pretas) e também a formação de agregados de células tumorais (em cachos) sugerindo processo de morte celular (setas vermelhas). Aum. 400 x.

Posteriormente verificamos o potencial de Aggrastat® em inibir a TCIPA para que pudéssemos compará-la com GST-INS. O Aggrastat® inibiu de forma eficaz a TCIPA e também de forma dose-dependente (Figura 30).

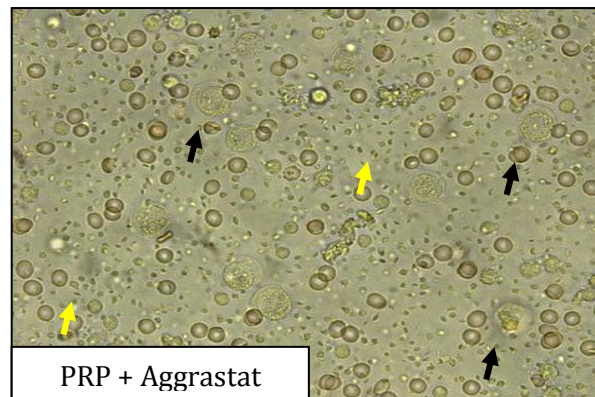
Figura 30 - Avaliação da ação da droga Aggrastat® na inibição da agregação plaquetária induzida por SK-MEL-28 em diferentes concentrações.



Foram adicionados 400 µL de PRP, incubado por 3 minutos a 37°C com a droga Aggrastat®, após esse período foram adicionadas as células tumorais na concentração de $5 \cdot 10^6$ células/mL e incubadas por 10 minutos.

Os resultados obtidos através da análise microscópica demonstraram que a amostra incubada com Aggrastat® (Figura 31) diferentemente da amostra com GST-INS, não apresentou aglomerados tumorais, o que possivelmente indica que estas células não se encontram em processo de morte celular, diferentemente do observado na amostra de células tumorais incubadas com GST-INS na presença do PRP (Figura 29).

Figura 31 - Microscopia de contraste de fase da amostra de Aggrastat®.



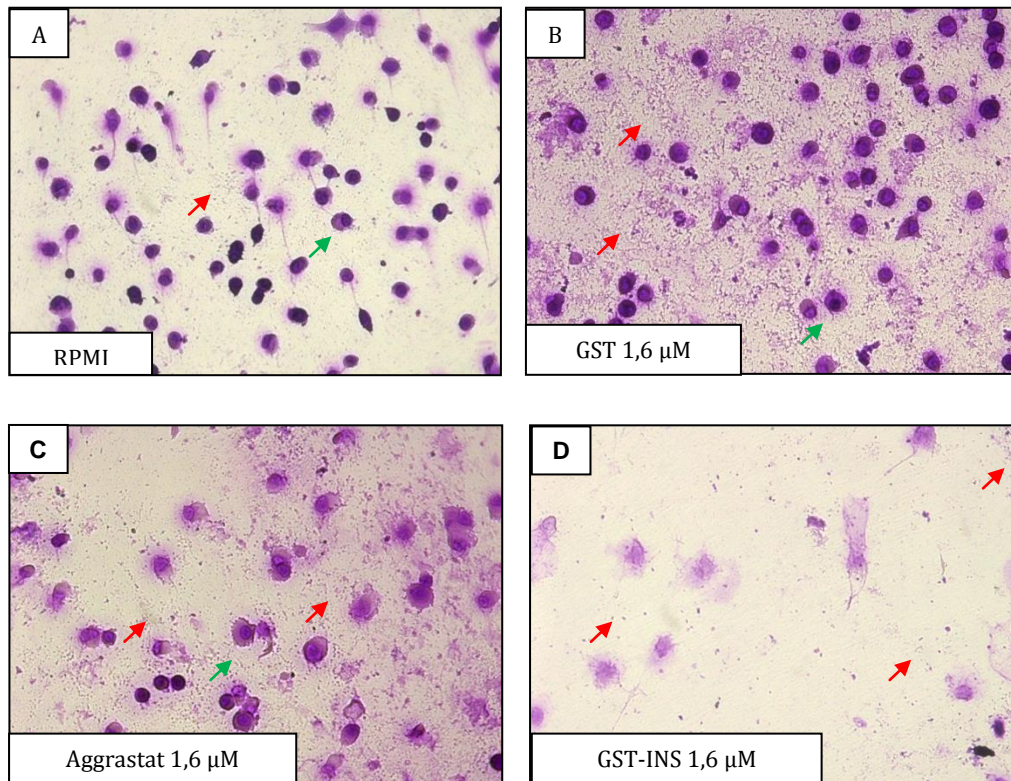
Microscopia das amostras na concentração de $0,05\mu\text{M}$ foi realizada após teste em agregômetro. As amostras foram transferidas, imediatamente, para uma placa de 48 poços e analisadas. É possível notar a ausência de agregados plaquetários, plaquetas (setas amarelas) e células tumorais (setas pretas) soltas. Aum. 400 x.

4.8 Análise da capacidade da GST-INS na inibição da adesão de células SK-MEL-28 às plaquetas, em condições estáticas

A literatura descreve que o processo de adesão de células tumorais às plaquetas é um mecanismo relevante na metástase tumoral e que, na biologia tumoral, o fibrinogênio contribui com a formação de êmbolos de células tumorais-plaquetas-fibrinogênio e tumor-tumor. Partindo dessas informações, após termos verificado (no ensaio anterior) que, em condições de fluxo (ensaios de agregometria) a GST-INS inibe a agregação plaquetária induzida por SK-MEL-28, nosso próximo passo foi avaliar a capacidade dessa molécula na inibição da adesão de células SK-MEL-28 às plaquetas imobilizadas, através de ensaios em condições estáticas.

Nossos resultados mostraram que SK-MEL-28 quando incubadas com GST-INS e posteriormente submetidas à adesão em substrato de plaquetas, apresentaram relevantes alterações morfológicas. Além disso, observou-se, microscopicamente, diminuição no número de células aderentes (Figura 32D) quando comparadas aos controles RPMI e GST e a droga Aggrastat® (Figura 32A, B e C, respectivamente). Essa inibição da adesão foi dependente das doses crescentes de GST-INS utilizadas.

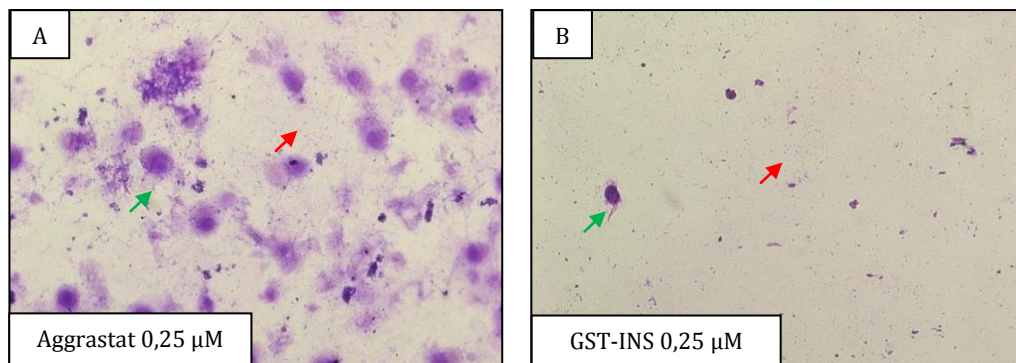
Figura 32 - Análise da capacidade da proteína GST-INS na inibição da adesão de SK-MEL-28 às plaquetas, em condições estáticas.



Células SK-MEL-28 aderidas às plaquetas. As setas vermelhas indicam plaquetas aderidas à placa de cultura e as setas verdes indicam as células tumorais. As imagens das amostras foram obtidas em microscópio óptico no aumento de 200 x.

Para confirmar os dados acima, utilizou-se doses menores da proteína recombinante GST-INS (Figura 33).

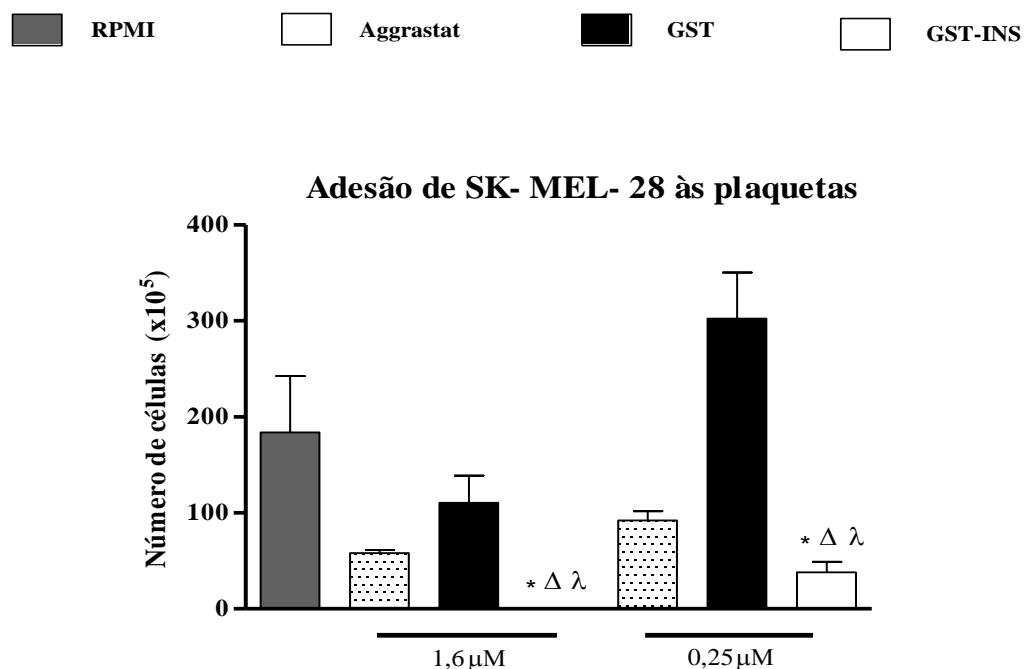
Figura 33 - Análise da capacidade da proteína GST-INS na inibição da adesão de SK-Mel-28 às plaquetas na dose de 0,25 µM.



Células SK-MEL-28 aderidas às plaquetas. As setas vermelhas indicam plaquetas aderidas à placa de cultura e as setas verdes indicam as células tumorais. As amostras foram obtidas em microscópio óptico no aumento de 200 x.

Na análise quantitativa, a GST-INS foi capaz de inibir significativamente a adesão das células de melanoma às plaquetas frente aos controles RPMI e GST e a droga Aggrastat® (Figura 34).

Figura 34 - Adesão de SK-MEL-28 às plaquetas imobilizadas.



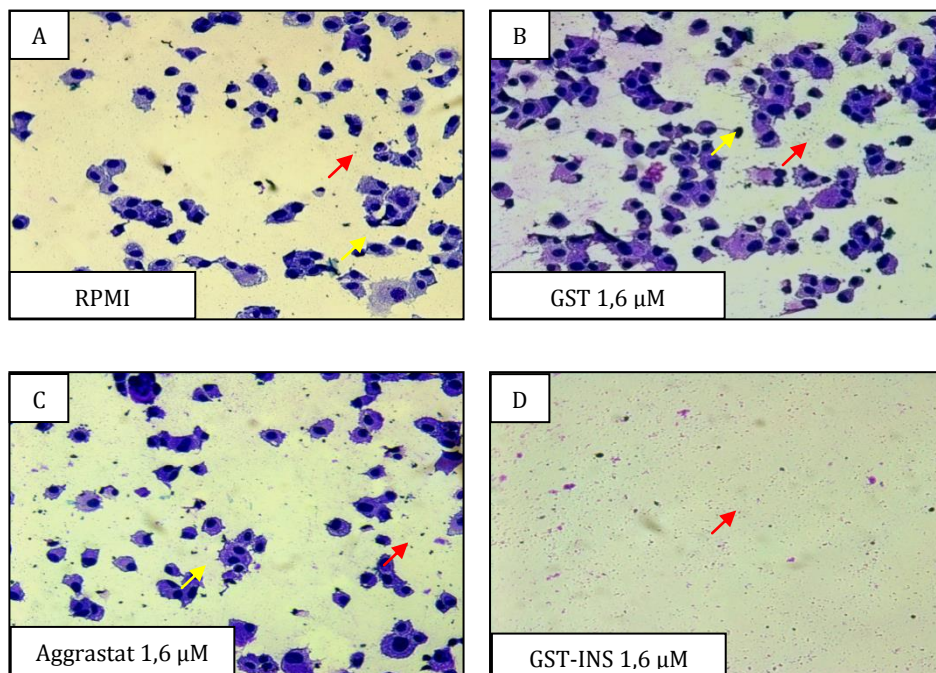
Placas de cultura com 96 poços foram pré- incubadas com plaquetas como substrato para adesão de SK-MEL-28. Após pré-incubação com os controles RPMI, Aggrastat ou GST e com a proteína GST-INS em diferentes doses, as células de melanoma foram adicionadas às plaquetas e incubadas por 2 horas. Os resultados obtidos foram expressos como média da contagem das células aderidas \pm DP das células das amostras em triplicatas e são representativos de três experimentos realizados de forma independente. O símbolo *, Δ e λ representa diferença significativa ($p < 0,05$) das células tratadas com GST-INS (1,6 μ M) em relação ao RPMI, Aggrastat® e GST, respectivamente. O símbolo *, Δ e λ representa diferença significativa ($p < 0,05$) das células tratadas com GST-INS (0,25 μ M) em relação ao RPMI, Aggrastat® e GST, respectivamente.

4.9 Análise da capacidade da GST-INS na inibição da adesão de células HUVECs às plaquetas, em condições estáticas

Um grande conjunto de dados experimentais e clínicos tem demonstrado o importante papel da interação entre células endoteliais/tumorais e plaquetas ativadas para a promoção da metástase tumoral. Dessa forma, nosso próximo passo foi avaliar a capacidade da GST-INS na inibição da adesão de HUVECs às plaquetas imobilizadas, através de ensaios em condições estáticas.

Nossos resultados, obtidos pela análise microscópica, mostraram que o tratamento de HUVECs com GST-INS comprometeu significativamente a adesão dessas células às plaquetas immobilizadas quando comparado aos controles RPMI e GST e com a droga Aggrastat®. Tal resultado pode ser comprovado através da análise microscópica (Figura 35 e 36) como na análise quantitativa (Figura 37).

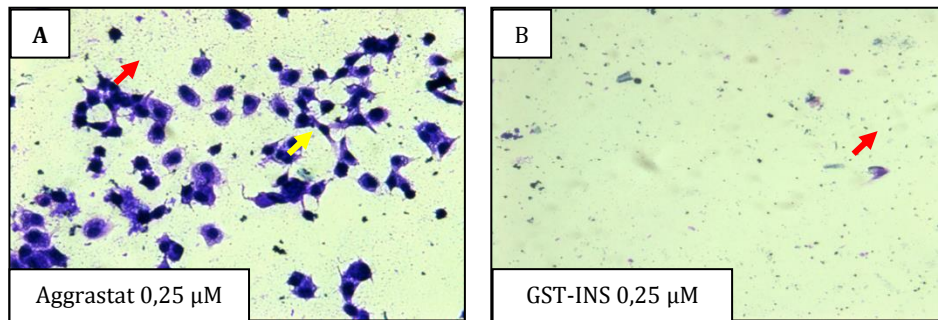
Figura 35 - Análise da capacidade da proteína GST-INS na inibição da adesão de HUVECs às plaquetas.



Células HUVECs aderidas às plaquetas. As setas vermelhas indicam plaquetas aderidas à placa de cultura e as setas amarelas indicam as células endoteliais. As imagens das amostras foram obtidas em microscópio óptico no aumento de 200 x.

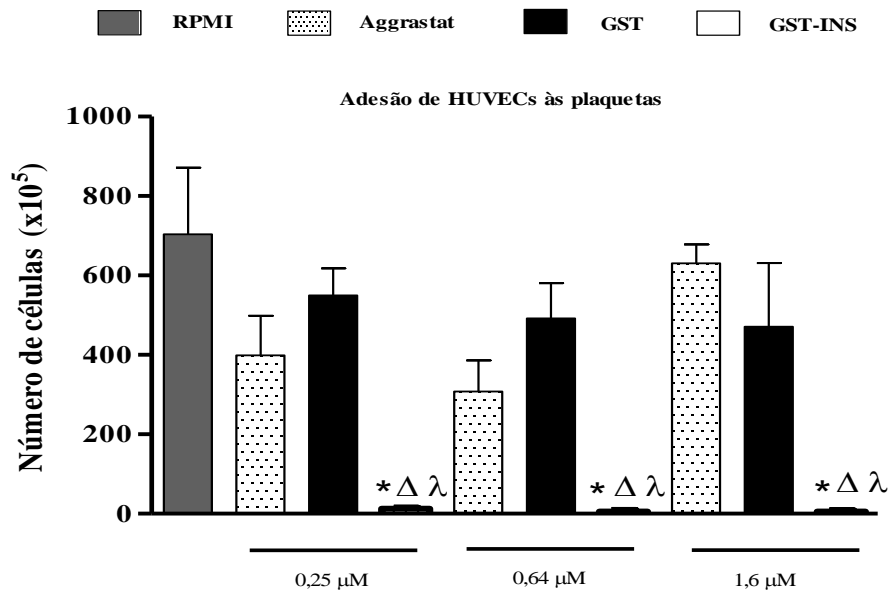
Para confirmar os dados acima, utilizou-se doses menores da proteína recombinante GST-INS (Figura 36A e B).

Figura 36 - Análise da capacidade da proteína GST-INS na inibição da adesão de HUVECs às plaquetas na dose de 0,25 μ M.



Células HUVECs aderidas às plaquetas. As setas vermelhas indicam plaquetas aderidas à placa de cultura e as setas amarelas indicam as células endoteliais. As imagens das amostras foram obtidas em microscópio óptico no aumento de 200 x.

Quando incubamos as células HUVECs com uma baixa concentração de GST-INS, essa proteína manteve-se eficiente, inibindo significativamente a adesão das células endoteliais às plaquetas, diferentemente do Aggrastat® (Figura 37).

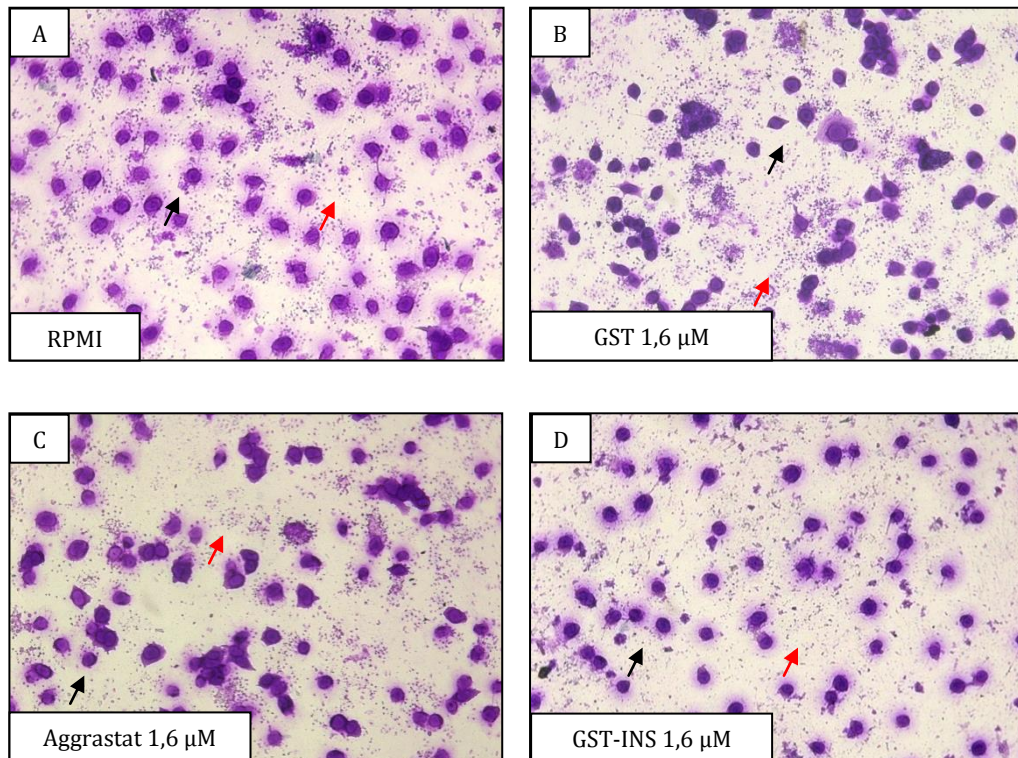
Figura 37- Adesão de HUVECs às plaquetas imobilizadas.

Placas de cultura com 96 poços foram pré- incubadas com plaquetas como substrato para adesão de HUVECs. Após pré-incubação com os controles RPMI, Aggrastat®, GST e com a proteína GST-INS em diferentes doses, as células endoteliais foram adicionadas às plaquetas e incubadas por 2 horas. Os resultados obtidos foram expressos como média da contagem das células aderidas \pm DP das células das amostras em triplicatas e são representativos de três experimentos realizados de forma independente. O símbolo *, Δ e λ representa diferença significativa ($p < 0,05$) das células tratadas com GST-INS (1,6 μ M) em relação ao RPMI, Aggrastat® e GST, respectivamente. O símbolo *, Δ e λ representa diferença significativa ($p < 0,05$) das células tratadas com GST-INS (0,64 μ M) em relação ao RPMI, Aggrastat® e GST, respectivamente. O símbolo *, Δ e λ representa diferença significativa ($p < 0,05$) das células tratadas com GST-INS (0,25 μ M) em relação ao RPMI, Aggrastat® e GST, respectivamente.

4.10 Análise da capacidade da GST-INS na inibição da adesão de fibroblastos (L929)

Os resultados de imagem obtidos com esse trabalho demonstraram que a GST-INS não interfere de forma expressiva na adesão de células L929 utilizadas como controle (Figura 38D) às plaquetas. Nessa análise, o padrão de adesão das células incubadas com GST-INS foi similar ao padrão encontrado para os controles RPMI e GST e para a droga Aggrastat® (Figura 38A, B e C).

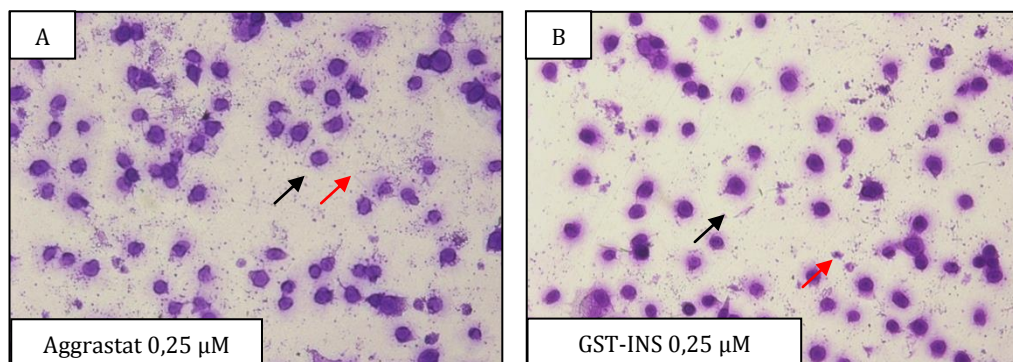
Figura 38 - Análise da capacidade da proteína GST-INS na inibição da adesão de L929 às plaquetas.



Células L929 aderidas às plaquetas. As setas vermelhas indicam plaquetas aderidas à placa de cultura e as setas pretas indicam os fibroblastos. As imagens das amostras foram obtidas em microscópio óptico no aumento de 200 x.

Assim como nos ensaios de adesão realizados anteriormente, com células tumorais e endoteliais, utilizamos a dose menor correspondente a 0,25 μM de GST-INS (Figura 39).

Figura 39 - Análise da capacidade da proteína GST-INS na inibição da adesão de L929 às plaquetas na dose de 0,25 μM.



Células L929 aderidas às plaquetas. As setas vermelhas indicam plaquetas aderidas à placa de cultura e as setas pretas indicam as células endoteliais. As imagens das amostras foram obtidas em microscópio óptico no aumento de 200 x.

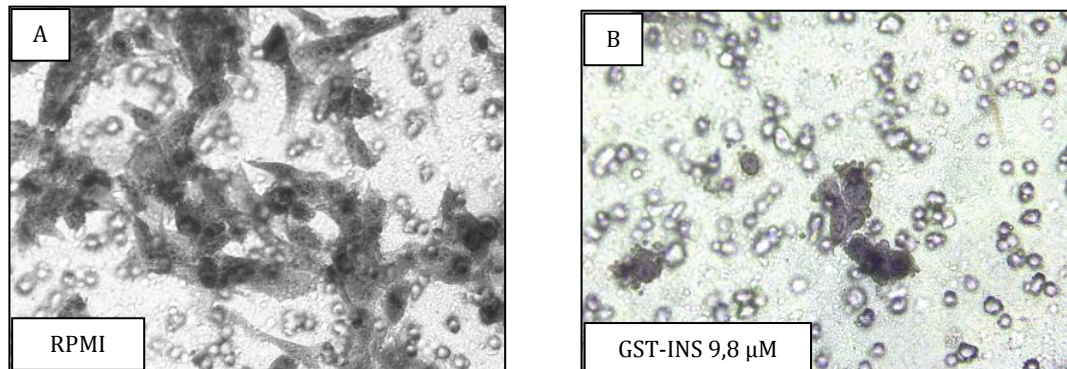
O padrão de adesão celular dos fibroblastos às plaquetas imobilizadas foi similar entre GST-INS e Aggrastat® quando ambos foram utilizados na menor dose (0,25 μM) (Figura 39A e B). Nossos dados demonstraram que independentemente da dose utilizada, a GST-INS não interfere na aderência de fibroblastos às plaquetas.

4.11 Análise da capacidade da GST-INS na inibição da invasão de células SK-MEL-28 ao substrato de Matrigel

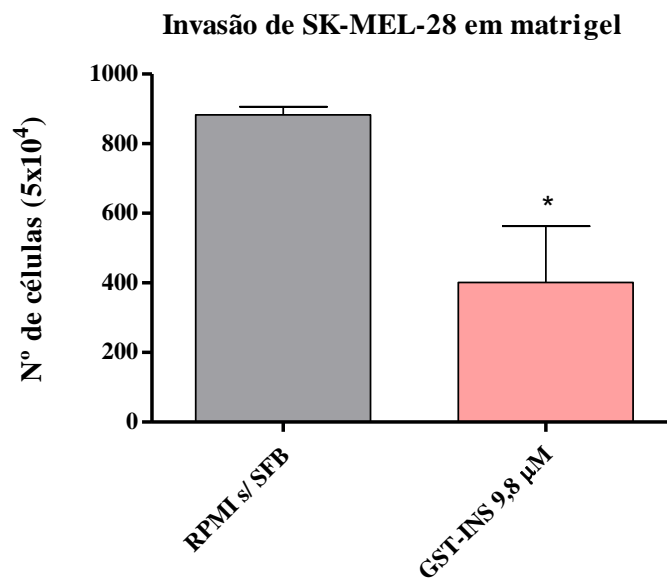
Melanoma é um dos tumores sólidos mais bem caracterizados no que diz respeito à invasão tumoral e metástase. De posse dessas informações, como continuidade ao nosso estudo, optamos por investigar o papel da GST-INS na inibição da invasão de células SK-MEL-28 através do matrigel.

As células incubadas com GST-INS que, eventualmente, invadiram o matrigel apresentaram-se com morfologia alterada, indicando perda de viabilidade (Figura 40a, quadro B) quando comparada ao controle (Figura 40a, quadro A). A análise quantitativa revelou que a GST-INS, quando utilizada na dose de 9,8 μM , inibiu 56% da invasão das células SK-MEL-28 ao substrato de matrigel (Figura 40b).

Figura 40 - Análise da capacidade da proteína GST-INS na inibição da invasão de células SK-MEL-28 ao matrigel.



(a) Análise microscópica da invasão de células SK-MEL-28 tratadas com GST-INS. As imagens das amostras foram obtidas em microscópio óptico no aumento de 400 x.



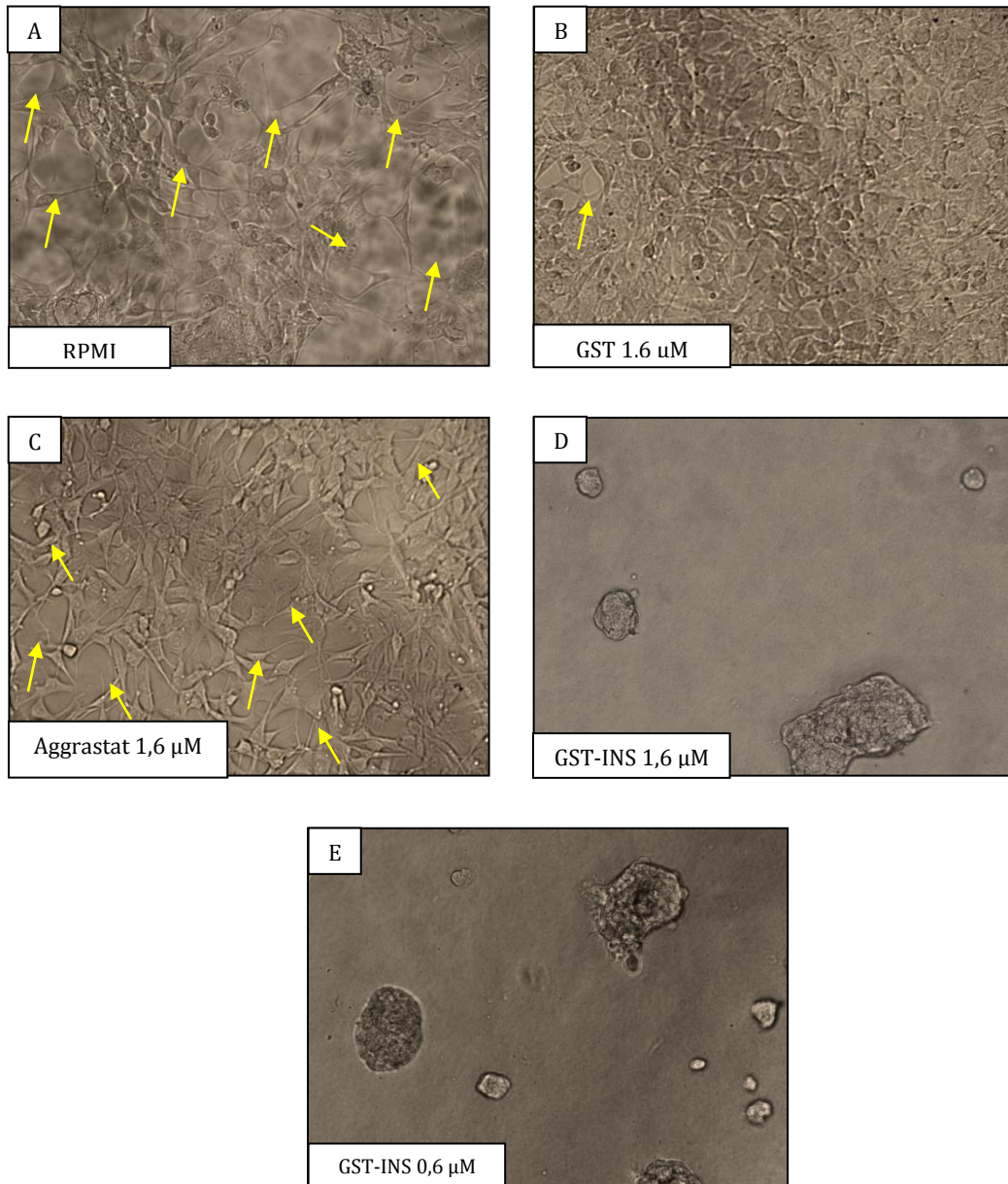
(b) Análise quantitativa da invasão de células SK-Mel-28 tratadas com GST-INS. Células SK-MEL-28 foram tratadas com RPMI sem SFB e com GST-INS na dose de 9,8 μ M. Após prévia incubação as células foram adicionadas ao compartimento superior contendo o substrato de matrigel e incubadas por 18 horas em placas com 24 poços contendo meio de cultura suplementado com 10% SFB. Os resultados obtidos foram expressos como média da contagem das células que invadiram \pm DP das células das amostras em triplicatas. O símbolo * representa diferença significativa ($p < 0,05$) das células tratadas com GST-INS em relação ao controle. O resultado representa três experimentos realizados de forma independente.

4.12 Análise da capacidade da GST-INS na inibição da formação de túbulos por células endoteliais t.End.1 em Matrigel

Em um ambiente tumoral, células endoteliais adjacentes recebem estímulos pró-angiogênicos para formar novos vasos sanguíneos. Diversos estudos têm destacado não só o papel da integrina $\alpha v\beta 3$, como também a relação da $\alpha IIb\beta 3$ no processo de angiogênese. Com o intuito de verificar o papel da GST-INS e do Aggrastat na angiogênese *in vitro*, utilizamos células t.End.1 tratadas com a GST-INS, GST ou Aggrastat® (1,6 μM e 0,6 μM).

A análise dos resultados, obtidos por microscopia, nos mostraram que a GST-INS interfere na angiogênese *in vitro*, uma vez que a proteína foi capaz de impedir totalmente a formação de túbulos endoteliais, em ambas as doses (Figura 41D e E). Resultados diferentes foram observados nos controles RPMI, GST ou Aggrastat® utilizados na mesma concentração, onde foi possível observar a organização, alinhamento e alongamento das células endoteliais para formação dos túbulos (Figura 41A, B e C).

Figura 41 - Microscopia de contraste de fase de células t.End.1 em substrato de matrigel. Análise da capacidade da proteína GST-INS na inibição da formação de túbulos por células t.End.1.



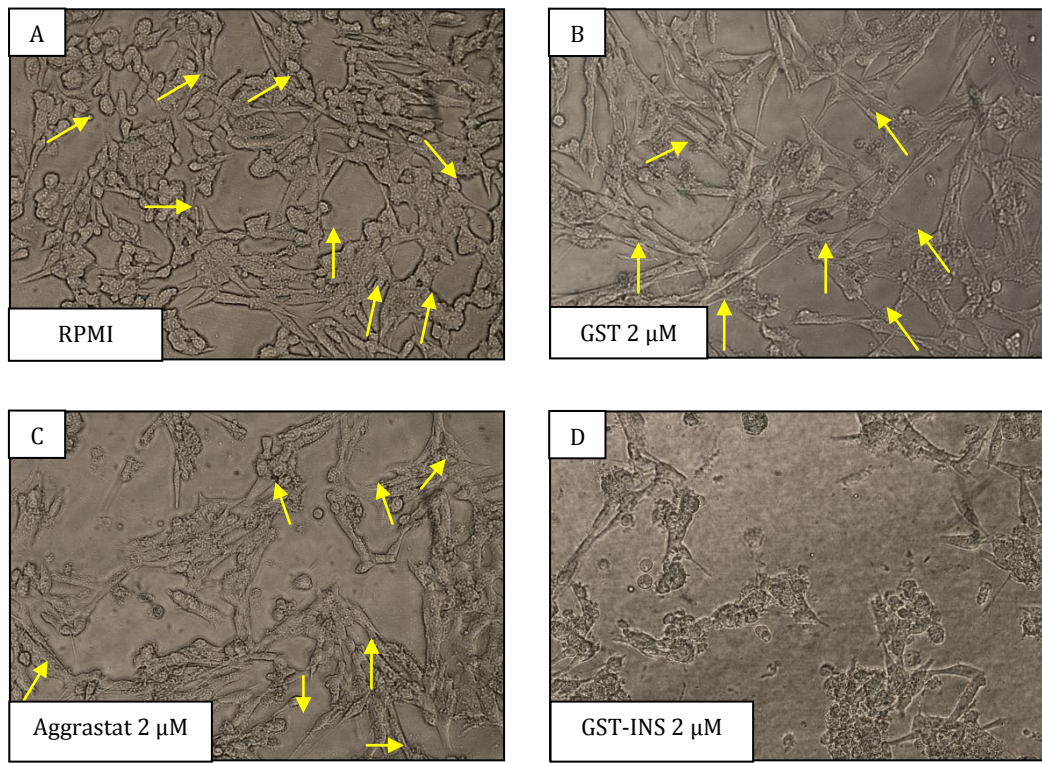
As setas em amarelo indicam os túbulos endoteliais formados na matriz. Aumento 200 x.

4.13 Análise da capacidade da GST-INS na inibição da formação de túbulos por SK-MEL-28

Para facilitar a microcirculação e a metástase, células de melanoma altamente invasivas são capazes de construir *in vitro* canais vasculares associados à matriz. Assim, para verificar o papel da GST-INS nesse mecanismo, incubamos em substrato de matrigel, células SK-MEL-28 previamente tratadas com 2 μ M da proteína.

Nossos resultados demonstraram que células de melanoma incubadas com os controles, RPMI, GST ou com a droga Aggrastat® foram capazes de se organizar no substrato e formar túbulos na matriz. Na imagem, pode-se notar células alongadas formando expansões em organização, caracterizando a formação de uma “rede” (Figura 42A, B e C). No entanto, células tratadas com GST-INS apresentaram alterações na sua morfologia, mostrando-se de forma desorganizada. Nota-se, em muitos planos, a presença de grumos, sugerindo perda de adesividade e, conseqüente, processo de morte celular (Figura 42D).

Figura 42 - Microscopia de contraste de fase de células SK-MEL-28 em substrato de matrigel. Análise da capacidade da proteína GST-INS na inibição da formação de túbulos por SK-MEL-28.

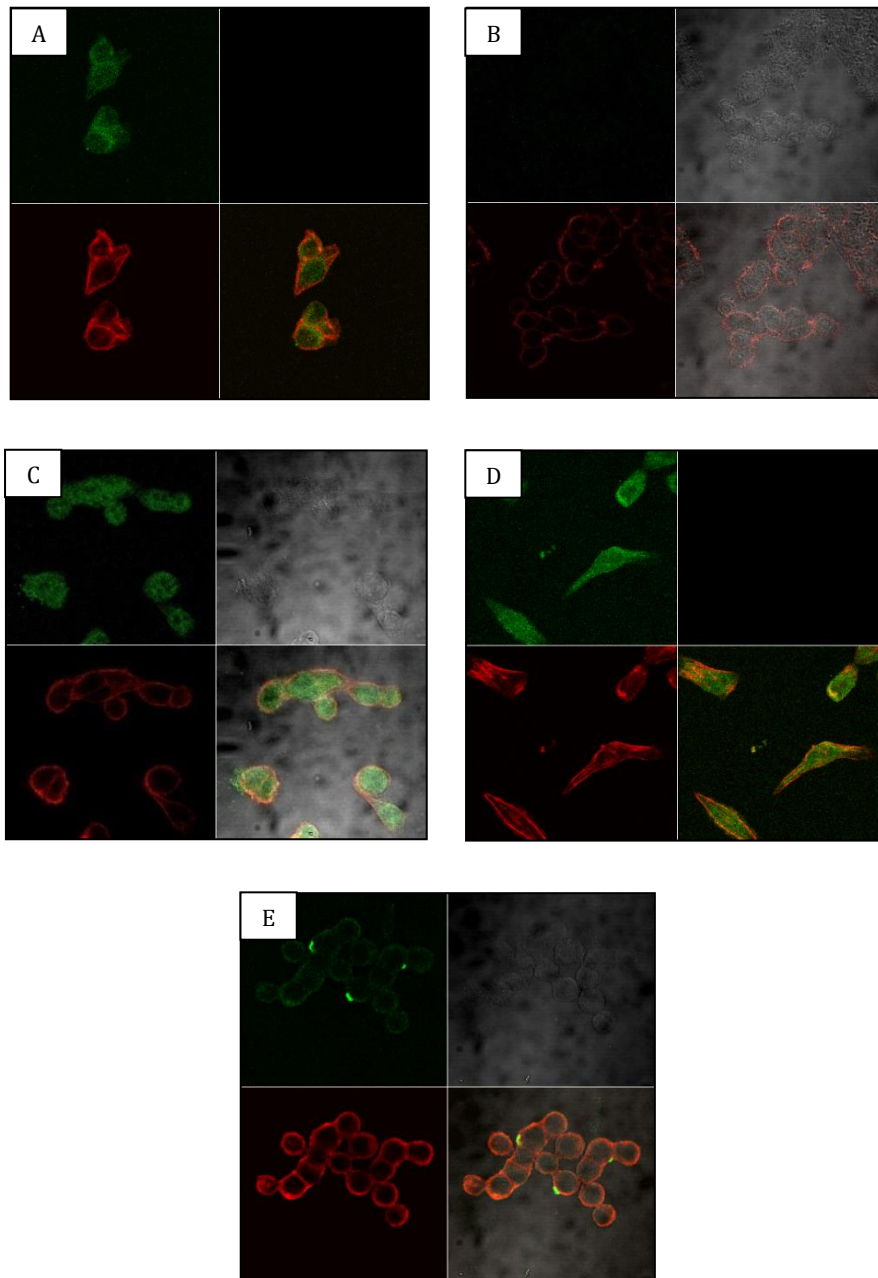


As setas em amarelo indicam os canais vasculares formados na matriz. Aum. 200 x.

4.14 Análise da interação da GST-INS com integrinas de células SK-MEL-28

Com o intuito de avaliar a interação da GST-INS com a integrina αv presente nas células SK-MEL-28, utilizamos análise por Microscopia Confocal. Nossos resultados nos mostraram que houve uma diminuição na marcação da *integrinas* αv , em células de melanoma tratadas com a GST-INS (Figura 43E). Diferentemente, as células tratadas com GST ou Aggrastat® (Figura 43C e D) apresentaram maior fluorescência dirigida à subunidade αv (verde). Além disso, observou-se que o citoesqueleto das células (vermelho) tratadas com os controles, manteve-se inalterado onde as células apresentaram-se morfologicamente conservadas e com notável espraiamento celular. Já as células tratadas com a disintegrina mostraram-se em formato esférico, organizada em cachos, fenômeno típico observado em células tumorais aderentes, em condições de estresse.

Figura 43 - Expressão de integrina αv em células SK-MEL-28 tratadas com GST-INS.



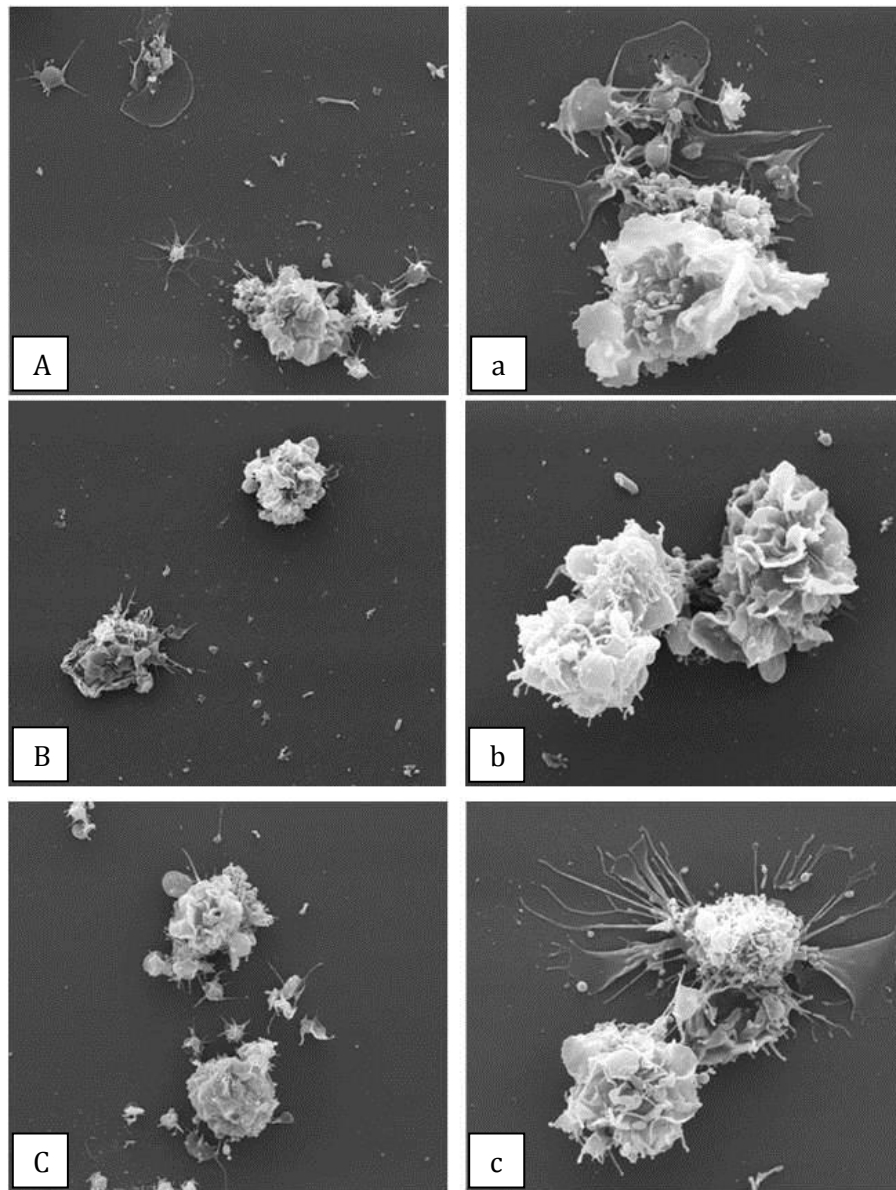
As células SK-MEL-28 foram incubadas durante 30 minutos na presença de $1,5 \mu\text{M}$ de GST-INS. As células foram então fixadas e o citoesqueleto de actina foi marcado com faloidinorodamina. As subunidades αv das integrinas foram marcadas com anticorpo de coelho anti- αv . Vermelho representa a coloração do citoesqueleto de actina e verde representa subunidade αv da integrina. (A) Células incubadas com anti- αv ; (B) Células incubadas com anticorpo secundário marcado anti-IgG de coelho; (C) Células incubadas com $1,5 \mu\text{M}$ de GST, (D) Células incubadas com $1,5 \mu\text{M}$ de Aggrastat®, (E) Células incubadas com $1,5 \mu\text{M}$ de GST-INS. As imagens são representativas de experimento realizado em triplicata, repetido por duas vezes, obtidos por microscopia confocal com uma ampliação de 400 x.

4.15 Microscopia eletrônica de varredura de plaquetas com células SK-MEL-28

Para avaliar a interação de plaquetas com células de melanoma SK-MEL-28 e o papel GST-INS durante esse contato, utilizamos análise qualitativa através de Microscopia Eletrônica de Varredura. Nossos resultados mostraram que na presença da GST-INS, houve uma relevante diminuição na aderência de células de melanoma, mostrando-se retraídas e morfológicamente esféricas, com poucas protruções de membrana e ausência de matriz extracelular ao seu redor. Também não foi possível notar a presença de plaquetas, possivelmente porque a pré-incubação com a GST-INS inibiu a integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, impossibilitando o contato com as células tumorais, sua ativação e consequente liberação de proteínas de matriz extracelular, como por exemplo, o fibrinogênio (importante na interação cruzada entre integrinas $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ e $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$).

Diferentemente, com o meio RPMI e com o Aggrastat® (Figura 44) observamos a presença de plaquetas notavelmente ativadas. A interação plaqueta-célula de melanoma teve como produto a liberação de matriz extracelular, bastante nítida nas imagens obtidas. Além disso, as células de melanoma mostram-se conectadas entre si através de prolongamentos membranares.

Figura 44 – Microscopia eletrônica de varredura de plaquetas com células SK-MEL-28 tratadas com GST-INS.



As células SK-MEL-28 foram incubadas por 2 horas na presença de plaquetas e 2 μM de GST-INS. As células foram então fixadas para visualização em microscópio eletrônico de varredura. (A-a) Células incubadas com plaquetas e meio RPMI; (B-b) Células incubadas com plaquetas e GST-INS; (C-c) Células incubadas com plaquetas e Aggrastat. As imagens são representativas de experimento realizado em triplicata, obtidos por microscópio eletrônico de varredura, escala 10 μm (letra maiúscula) e 5 μm (letra minúscula).

5 DISCUSSÃO

Diversos estudos buscam compreender o potencial terapêutico de inibidores de integrinas relacionadas a patologias dependentes de adesão celular como trombose, metástase e angiogênese tumoral. Dentro desses inibidores, a literatura descreve o potencial papel das disintegrinas, isoladas de venenos de serpentes, que interferem seletivamente na adesão celular e na inibição de agregados plaquetários (HUANG et al., 2001; MCLANE et al., 1998). O trabalho de Della-Casa et al., (2011) elucidou o papel de uma RGD-disintegrina do veneno de *B. insularis*, obtida na forma nativa e recombinante (GST-INS) que atua como potente inibidor de agregação plaquetária e como inibidor da adesão de células endoteliais ao fibrinogênio, sugerindo um importante papel dessa molécula como um antagonista da integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (presente em plaquetas) e $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ (presente em células endoteliais).

Nesse trabalho, os autores demonstraram em ensaios de agregação plaquetária a capacidade inibitória da GST-INS via ADP. Em nossos resultados foi possível observar que a atividade biológica da insularina manteve-se conservada (inibindo 80% da agregação plaquetária via ADP na dose de $1,2\mu\text{M}$), indicando que a proteína de estudo estava em condições biológicas ótimas para o desenvolvimento do presente trabalho. No presente trabalho, também determinamos o IC₅₀ da GST-INS correspondente a $\sim 0,45\mu\text{M}$.

Nosso próximo passo foi investigar o papel de células SK-MEL-28 na indução de agregação plaquetária, comparar essa indução com outra linhagem tumoral (células HeLa), além de verificar a importância de plaquetas e de proteínas plasmáticas no fenômeno de TCIPA.

Células tumorais malignas são capazes de ativar e agregar plaquetas levando à formação de trombos através de TCIPA. A TCIPA possui um importante papel na habilidade de disseminação das células tumorais e também é um marcador metastático importante presentes em alguns tumores (NASH et al., 2002).

Trabalhos demonstram que muitas proteínas estão envolvidas na TCIPA e apontam a integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, abundantemente expressa por plaquetas, como a mais importante nesse processo (ALONSO-ESCOLANO et al., 2004). Plaquetas também podem expressar integrinas $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, porém em menores quantidades, diferentemente de algumas células tumorais que superexpressam este receptor. Ambas as integrinas possuem papel fundamental na TCIPA, auxiliando na conexão entre proteínas do plasma, como o fibrinogênio, tumores e plaquetas (FELDING-HABERMANN et al., 1996).

Para avaliarmos se o fato de adicionarmos células tumorais por si só já induziria uma resposta de agregação plaquetária, utilizamos outra linhagem tumoral, HeLa. Assim, diferentemente, do encontrado para células SK-MEL-28, as células HeLa, mesmo quando utilizadas em concentrações altas não foram capazes de induzir a agregação plaquetária. Dessa forma, diferentemente, as células SK-MEL-28 poderiam liberar importantes mediadores que ativariam as plaquetas, promovendo sua agregação via proteínas plasmáticas. Na literatura não encontramos trabalhos descrevendo a capacidade das células da linhagem SK-MEL-28 na indução da agregação plaquetária. Logo, nossos resultados são pioneiros na demonstração da agregação plaquetária induzida por esse tipo celular. Células de melanoma apresentam alta expressão de integrinas do tipo $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ (HORTON, 1990) e dessa forma interagem com plaquetas via fibrinogênio, ligando-se às integrinas $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ que contribui para a formação de trombos. Além disso, trabalhos nos mostram que para induzir agregação plaquetária, células tumorais podem gerar moléculas estimuladoras, como ADP (CAMEZ et al., 1986), Tromboxano A2 (HONN et al., 1987) e MMP-2 (JURASZ et al., 2001) e que essas moléculas são responsáveis pelo aumento na incidência de trombose em pacientes com câncer (HEINMÖLLER et al., 1995). Heinmöller et al., (1996) em seu trabalho demonstraram que células de câncer de pulmão são capazes de ativar plaquetas *in vitro* através da liberação de ADP e trombina. Seus dados mostram também que o bloqueio apenas de uma via de agregação não é suficiente para inibir a TCIPA, isso porque quando utilizaram um inibidor específico de trombina (hirudin) não houve

significante inibição da agregação plaquetária. No entanto, seus resultados demonstram que o uso combinado de hirudin com apyrase (inibidor de ADP) eficazmente inibe o contato plaqueta-célula tumoral e a agregação plaquetária, o que ressalta a importância pelo uso de inibidores que atuem em mais de um alvo.

Nossos resultados demonstraram que o aumento da agregação plaquetária foi proporcional ao aumento da concentração de SK-MEL-28, o que corrobora com os resultados encontrados por Lian et al., (2013) onde foi utilizado números crescentes de células de tumor de mama (MCF-7) para induzir a agregação plaquetária.

Verificamos também que as células tumorais utilizadas no nosso modelo de estudo, SK-MEL-28, não podem formar agregados entre si somente na presença de proteínas plasmáticas (PPP), demonstrando, dessa forma, que as proteínas plasmáticas juntamente com as plaquetas são essenciais no processo.

O trabalho de Saitoh et al., (2014) demonstrou que após injeção de melanoma B16-BL6 em camundongos, houve agregação plaquetária ao redor das células tumorais já no minuto 5 após a injeção. Notou-se, através de técnicas obtidas por imagens, o depósito de monômeros de fibrina com densa deposição de fibrinogênio ao redor dos agregados plaquetários e das células de melanoma, indicando a formação inicial de trombos.

Com relação, a inibição da agregação plaquetária induzida por células tumorais, a proteína experimental GST-INS, demonstrou ser eficiente na inibição da agregação, com IC₅₀ ~1,08µM, apresentando assim eficácia semelhante na inibição da agregação induzida por ADP exógeno. Na literatura, encontramos apenas três disintegrinas obtidas na forma nativa, isolada de venenos, atuando no modelo de TCIPA experimental: a triflavina (que contém sequência ARGDF), com células de hepatoma humano (SHEU et al., 1992), a rhodostomina (que contém a sequência PRGDMP) e a trigramina (que contém a sequência ARGDDL) ambas com adenocarcinoma de cólon (CHIANG et al., 1994). Dessa forma, nosso estudo é original por apresentar a

primeira disintegrina recombinante que contém a sequência ARGDNP, com potente ação na TCIPA.

Embora o Aggrastat® tenha demonstrado maior potencial na inibição da agregação plaquetária, induzida por SK-MEL-28, com IC50 de $\sim 0,0007\mu\text{M}$, as imagens obtidas por microscopia mostram plaquetas e células tumorais dispersas de forma homogênea nas amostras tratadas com Aggrastat®, em vários campos microscópicos analisados. Diferentemente, nas amostras tratadas com GST-INS, nota-se a presença de agrupamentos de células tumorais, com notável alteração morfológica, fundindo-se em cachos, sugerindo perda de viabilidade celular.

Estudos têm evidenciado a importância de plaquetas como reguladoras da estabilidade e migração tumoral (LONSDORF et al., 2012). Para compreensão desse mecanismo, inúmeros testes têm sido realizados com o intuito de comprovar a interface entre célula endotelial-plaqueta-célula tumoral através do bloqueio de receptores, como as integrinas, presentes na superfície celular. Sabe-se que as plaquetas quando ativadas expressam as integrinas $\alpha\text{IIb}\beta 3$ e células tumorais e/ou endoteliais expressam a integrina $\alpha\text{v}\beta 3$, e a interação entre essas duas últimas com plaquetas ocorre via fibrinogênio. Dessa forma, ambas as integrinas ligam-se aos componentes da matriz extracelular formando uma rede (LIU et al., 2009). Assim, para verificarmos, a interferência da GST-INS na adesão de células endoteliais HUVECs e de melanoma SK-MEL-28 às plaquetas, utilizamos o modelo de ensaio de adesão em condições estáticas. Para nos certificarmos de que as plaquetas permaneceram devidamente aderidas às placas, sem sofrer a interferência das proteínas de estudo, incubamos as plaquetas, já aderidas, com altas doses de GST, Aggrastat® ou GST-INS e verificamos que esse tratamento não revelou diferenças na homogeneidade e quantidade dessas plaquetas quando comparadas àquelas incubadas com PBS (dados obtidos na iniciação científica). Esses resultados estão de acordo com Lonsdorf et al., (2012) que observaram que o tratamento de plaquetas previamente aderidas em placas não sofre alterações quantitativas e de viabilidade quando incubadas com o peptídeo RGD ou com o anticorpo monoclonal JON/A (anti - $\alpha\text{IIb}\beta 3$).

Sendo assim, uma vez excluída a possibilidade das proteínas alterarem o revestimento das placas (afetando as plaquetas), fomos verificar a adesão de HUVECs ou SK-MEL-28 às plaquetas: 1) nos nossos ensaios de co-cultura utilizando HUVECs e plaquetas, foi possível observar notável redução da adesão dessas células endoteliais às plaquetas quando as HUVECs foram previamente incubadas com GST-INS, diferentemente do encontrado com GST, Aggrastat® ou com RPMI. Essa inibição já pôde ser detectada em baixas doses (0,25µM), demonstrando o alto potencial inibitório da GST-INS na adesão entre as duas células. Este resultado é consonante ao que foi visto nos experimentos realizados por Bombeli et al., (1998) em que incubaram células HUVECs com o anticorpo LM609 (anti- $\alpha v\beta 3$) ou com o peptídeo RGD (inibidores do receptor GPIIb/IIIa). Os resultados obtidos por esses autores demonstraram que aproximadamente 60% das células endoteliais permaneceram aderidas. Comparativamente aos nossos resultados, a GST-INS apresentou maior potencial inibitório já que a mesma foi capaz de inibir totalmente a adesão de células HUVECs às plaquetas, demonstrando atividade disintegrina preservada.

2) nos nossos ensaios de co-cultura utilizando SK-MEL-28 e plaquetas observou-se uma diminuição do número de células tumorais aderidas às plaquetas, onde verificou-se perda da integridade da membrana celular (nas doses mais altas), o que confirma o efeito antagonista da insularina na adesão tumoral às plaquetas e possível atividade de apoptose.

O fato de GST-INS atuar de forma potente na TCIPA e na adesão de células endoteliais/tumorais às plaquetas sugere a ação dessa disintegrina em alvos celulares envolvidos no contexto de metástase tumoral o que é reforçado por trabalhos que destacam a importância das integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha IIb\beta 3$ e sua relação na migração de células tumorais e endoteliais através de um efeito sinérgico entre essas integrinas (GOMES, et al., 2004; LIU, et al., 2009). Diferentemente, Aggrastat® apesar de inibir a TCIPA induzida por SK-MEL-28, foi menos potente na inibição tanto de células endoteliais como de tumorais às plaquetas. Nos ensaios realizados por Trikha et al., (2002) utilizando um bloqueio com dois anticorpos 7E3 Fab e 7E3 F(ab')₂ (inibidores de $\alpha IIb\beta 3$ e $\alpha v\beta 3$) foi possível observar uma diminuição na adesão

de melanoma às células HUVEC. O bloqueio concomitante desses dois receptores foi mais eficiente na inibição da angiogênese e da metástase do que quando utilizado inibidores monoespecíficos de integrinas. Lian et al., (2013) utilizaram três drogas: SZ-1 (anticorpo monoclonal dirigido contra GPIX/GPIIb β), 7E3 (anticorpo monoclonal dirigido contra GPIIb/IIIa) e Apyrase que quando combinadas foram mais potentes em inibir a TCIPA do que quando utilizados isoladamente. Dessa forma, observamos a importância na inibição de mais de uma via, durante a TCIPA, para que haja uma maior eficácia no tratamento. Com isso, GST-INS demonstra ser uma importante ferramenta de estudo na TCIPA, já que nossos resultados sugerem uma ação seletiva e bifuncional em integrinas α IIb β 3 e α v β 3.

Na maioria das vezes, agentes antitumorais aplicados na clínica, exercem efeitos colaterais relevantes em células adjacentes. Assim a busca por drogas que atuem em alvos específicos é um dos grandes desafios da pesquisa em terapia antitumoral. Dessa forma, optamos por avaliar a citotoxicidade da insularina, através de ensaio de viabilidade celular, onde tratamos as células L929 (fibroblastos) com a GST-INS em diferentes doses e períodos de incubações. Observou-se através dos nossos resultados (em ambas as metodologias) que a GST-INS não interfere na viabilidade dos fibroblastos, nem na adesão dessas células às plaquetas. Sendo assim demonstramos, através de nossos ensaios, a especificidade da GST-INS em atuar sobre células cuja expressão de integrinas α v β 3 encontram-se anormais (“overexpress”), tal como o câncer e em processos de ativação endotelial, mas que em condições fisiológicas normais, essa é praticamente ausente. Nossos dados corroboram com os obtidos por Ribeiro et al., (2014), onde utilizaram linhagem de monócitos/macrófagos e células HUVECs para verificar a citotoxicidade da DisBa-1, uma disintegrina recombinante ARGDDM (*Bothrops alternatus*). Seus resultados demonstraram que essa disintegrina, semelhantemente à GST-INS, não possui efeito citotóxico direto em ambas as linhagens. No entanto, embora não haja significativa redução na viabilidade celular, as células HUVECs que superexpressam α v β 3, quando tratadas com DisBa-01 na dose de 5 μ M, por 24 horas, tiveram uma maior redução na viabilidade (cerca de 20%).

A angiogênese está envolvida em importantes mecanismos patológicos como o crescimento tumoral, metástase e em várias doenças inflamatórias. O complexo processo angiogênico envolve uma série de enzimas que degradam a matriz e favorecem a migração de células endoteliais pelos espaços perivasculares, bem como a proliferação, o alinhamento para formar estruturas tubulares e por fim a formação de novos vasos (BISCHOFF, 1997). A interação entre integrinas presentes nas células endoteliais e a matriz extracelular é essencial para esse processo. Inúmeros estudos destacam o papel da integrina $\alpha v\beta 3$ durante a angiogênese, uma vez que somente são expressas em altos níveis por vasos angiogênicos e pouco detectáveis em vasos quiescentes (BROOKS et al., 1994). Em nosso ensaio de angiogênese in vitro, a GST-INS, quando utilizada mesmo em baixas doses, 1,25 e 0,6 μM , inibiu totalmente a capacidade das células endoteliais se alinharem e formarem túbulos que mimetizam o processo de angiogênese. No trabalho de Yeh et al., (1998) mostraram que a acutinina, uma disintegrina nativa ARGDDL (*Agkistrodon acutus*) foi capaz de inibir a angiogênese in vitro de células HUVECs quando tratadas com a disintegrina numa concentração de 2 e 0,25 μM , além disso, mostrou-se mais eficiente do que quando utilizaram o Eptifibatide (antagonista específico da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$) que não apresentou qualquer efeito inibitório na angiogênese. O mesmo foi observado no trabalho de Yeh et al., (2001) utilizando a rhodostomina, uma disintegrina nativa PRGDMP (*Calloselasma rhodostoma*) capaz de inibir a formação de túbulos por células HUVECs em substrato de matrigel, mesmo na presença de bFGF. Seus resultados mostraram que a disintegrina foi capaz de inibir significativamente a angiogênese in vitro de maneira dose dependente (0,1; 0,3; e 1 μM), diferentemente o Eptifibatide na dose de 10 μM não mostrou-se capaz de inibir a formação dos túbulos.

Sabe-se que células de melanoma altamente invasivas e metastáticas possuem a capacidade de formar estruturas vasculares independentemente da angiogênese por células endoteliais. Assim, investigamos o papel da GST-INS na inibição da formação de túbulos por células SK-MEL-28 em ensaio de Matrigel. Nossos resultados, obtidos por microscopia, nos mostraram que células de melanoma tratadas com a GST-INS, em baixas doses, foram

incapazes de formar canais na matriz. Recentemente, Ruffini et al., (2015) demonstraram que o Cilengitide (um potente inibidor de integrina αv) foi capaz de inibir a expressão de VEGF-A, MMP9, bem como a capacidade invasiva e vasculogênica de células de melanoma, respectivamente. Assim, a busca por inibidores de integrinas constitutivamente expressas por células de melanoma é um importante alvo para o controle da formação de estruturas vasculares, inibindo assim mais um mecanismo que favorece a nutrição e o crescimento tumoral.

A expressão de integrinas $\beta 3$ também está diretamente relacionada à malignidade de melanoma. Em um estudo prospectivo realizado por Hieken et al., (1999) investigou-se a expressão de integrinas $\beta 3$ em pacientes diagnosticados com melanoma de médio grau, onde demonstrou-se a relação da expressão dessa integrina com a progressão da doença, sendo que 64% dos pacientes expressaram a integrina $\beta 3$ e cerca de 45% dos pacientes com melanoma $\beta 3$ positivos eram mais propensos a morrer pela doença quando comparados aos pacientes melanoma $\beta 3$ negativo (8%).

Em células cancerosas, integrinas αv também estão associadas à um prognóstico maligno, visto que sua interação com a matriz é essencial para sobrevivência e progressão da doença. Um estudo realizado por Koistinen et al., (2004), mostrou que apenas as linhagens de melanoma metastáticas apresentaram alta expressão da integrina αv , enquanto que células de melanoma originadas de um tumor primário foram negativas para esse receptor. Além disso, a literatura também demonstra que quando a integrina αv é inibida há um aumento na apoptose de células tanto de melanoma como de carcinoma intestinal humano (KOSLOVA et al., 2001; MONTGOMERY et al, 1994). Dessa forma, nosso próximo passo foi conferir a interação da GST-INS com a integrina αv expressa nas células SK-MEL-28. Nossos resultados obtidos por microscopia confocal demonstraram que a GST-INS foi capaz de se ligar às integrinas αv presente na célula SK-MEL-28, uma vez que não foi possível observar fluorescência nas células tratadas com a disintegrina e marcadas com anticorpos dirigidos a essa integrina. Isso demonstra que a GST-INS possui afinidade pela subunidade correspondente αv , reconhecida especificamente pelo anticorpo utilizado.

Melanomas têm uma grande capacidade em invadir e se disseminar para outros tecidos. Dado o seu alto potencial metastático, muitos trabalhos vêm buscando compreender os mecanismos associados à sua malignidade. Torna-se cada vez mais evidente que o microambiente tumoral, composto por componentes da matriz extracelular e células estromais exercem papel fundamental na invasão e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Assim, nosso objetivo foi também avaliar a capacidade da GST-INS em inibir a invasão de células de melanoma em matrigel. Nossos resultados mostraram que a insularina (9,8 μM) foi capaz de inibir 56% a invasão de células de melanoma. Semelhantemente, no trabalho de Lucena et al., (2012), a r- viridistatin 2 (*Crotalus viridis viridis*) e a r- mojustin 1 (*Crotalus scutulatus scutulatus*) ambas disintegrinas recombinantes RGD, mostraram-se capazes de inibir a invasão de células SK-MEL-28 (84% e 69%, respectivamente) ao matrigel na dose de 6,3 μM .

Suzuki et al., (2004) demonstraram que células de adenocarcinoma pancreático quando incubadas na presença de plaquetas, tiveram sua capacidade invasiva aumentada, apresentando níveis elevados de MMP-9 (metaloproteinase importante na degradação da matriz e invasão tumoral). No entanto, quando utilizaram agentes antiplaquetários, as células tumorais diminuíram sua invasividade e também a secreção de MMP-9.

Ensaio futuros serão realizados pelo nosso grupo, a fim de avaliar o papel da GST-INS, em doses mais baixas, durante a invasão *in vitro* de células de melanoma na presença de plaquetas. Além disso, análise da expressão gênica por RT-PCR (reação de transcriptase reversa em tempo real) elucidará quais metaloproteinases e citocinas estão sendo produzidas durante esse mecanismo.

Evidenciamos através das imagens obtidas através dos resultados de microscopia eletrônica de varredura (MEV) que a GST-INS influencia na adesão das células SK-MEL-28, pois é notável a retração da membrana celular. Além disso, não observamos a presença das plaquetas, possivelmente devido à prévia incubação com a insularina que culminou no bloqueio da integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, impossibilitando sua aderência à célula tumoral. Nossos dados também demonstram que com exceção da amostra

com GST-INS, todas apresentaram proteína de matriz extracelular ao redor das células de melanoma-plaquetas. Esses achados corroboram com dados da literatura onde mostram que células tumorais malignas secretam grandes quantidades de proteínas de matriz extracelular como mecanismo de sobrevivência e que este fator pode contribuir para a resistência terapêutica levando à progressão do tumor (ARVELO et al., 2016; PUPA et al., 2002).

Nossos resultados indicam a ação da GST-INS como uma ferramenta importante na inibição e no estudo de fenômenos de adesão dependentes de integrinas dentro do contexto de metástase tumoral dependente de plaquetas, angiogênese e vasculogênese. Esse trabalho é original por demonstrar pela primeira vez a ação de uma disintegrina recombinante no modelo de TCIPA, no modelo de adesão de células endoteliais/tumorais às plaquetas e no mimetismo de vasculogênese por células de melanoma. Ensaio sobre mecanismos e vias de sinalização pelas quais a GST-INS interfere nesses fenômenos serão conduzidos futuramente juntamente com estudos *in vivo*.

5 CONCLUSÕES

- A GST-INS não comprometeu a viabilidade de fibroblastos;
- Este é o primeiro estudo que mostra a agregação plaquetária induzida por células de melanoma SK MEL-28;
- A GST-INS mostrou um importante papel na TCIPA, inibindo a agregação plaquetária induzida por SK-MEL-28. A inibição foi dependente da dose;
- A GST-INS inibiu adesão *in vitro* de células SK-MEL-28 ou HUVECs às plaquetas.
- A GST-INS inibiu a invasão de células SK-MEL-28 ao matrigel;
- A GST-INS inibiu a formação de túbulos *in vitro* por células endoteliais t.End.1;
- A GST-INS inibiu a vasculogênese *in vitro* por células SK MEL-28;
- A GST-INS interage com a integrina α_v de células SK-MEL-28.
- Em análise por microscopia de varredura observamos que a GST-INS impede a adesão de plaquetas com células de melanoma SK-MEL-28, interfere na aderência das células tumorais e inibe a produção de proteínas de matriz extracelular.

REFERÊNCIAS *

- ABULENCIA, J. P. et al. Comparative antiplatelet efficacy of a novel, nonpeptide GPIIb/IIIa antagonist (XV454) and abciximab (c7E3) in flow models of thrombosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.21, n.1, p.149–156, 2001.
- ALENGHAT, F. J.; INGBER, D. E. Mechanotransduction: All signals point to cytoskeleton, matrix, and integrins. **Science Signaling**, v.119, p.1-4, 2002.
- ALONSO-ESCOLANO, D. et al. Membrane type-1 matrix metalloproteinase stimulates tumour cell-induced platelet aggregation: role of receptor glycoproteins. **British Journal of Pharmacology**, v.141, n.2, p.241–252, 2004.
- AMIRKHOSRAVI, A. et al. Blockade of GPIIb/IIIa inhibits the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) from tumor cell-activated platelets and experimental metastasis, **Platelets (Abingdon)**, v.10, n.5, p. 285–292, 1999.
- APLIN, A. E.; KAPLAN, F. M.; SHAO, Y. Mechanisms of resistance to RAF inhibitors in melanoma. **Journal Investigative Dermatology**, v.131, n.9, p.1817-1820.
- AOUDJIT, F.; VUORI, K. Integrin Signaling in Cancer Cell Survival and Chemoresistance. **Chemotherapy Research and Practice**, p.1-16, 2012.
- ARVELO, F.; SOJO, F.; COTTE, C. Tumour progression and metastasis. **eCancermedicalsecience**, v.10, n.617, 2016.
- ASSOIAN, R. K.; KLEIN, E. A. Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness. **Trends in Cell Biology** , v.18, n.7, p.347-352, 2008.
- BALCH, C.M. et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification, **Journal of Clinical Oncology**, v.27, n.36, p.6199-6206, 2009.
- BARCZYK, M.; CARRACEDO, S.; GULLBERG, D. Integrins. **Cell Tissue Research**, v.339, n.1, p.269–280, 2010.
- BISCHOFF, J. Cell Adhesion and angiogenesis. **The Journal Clinical of Investigation**, v.100, n.11,p.37-39, 1997.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração, Rio de Janeiro, 2002.

BITTNER, M. et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. **Nature**, v.406, n.6795, p.536-540, 2000.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Snake venom metalloendopeptidases: Reprolysins. **Methods in Enzymology**, v.248, p.345–368, 1995.

BOMBELI, T.; SCHWARTZ, B. R.; HARLAN, J. M. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa- dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular molecule 1 (ICAM-1), $\alpha\beta 3$ Integrin, and GPIba. **The Journal Experimental Medicine**, v.187, n.3, p.329-339. 1998.

BROOKS, P. C.; CLARK, R. A.; CHERESH D. A. Requirement of vascular integrin $\alpha v\beta 3$ for angiogenesis. **Science**, v.264, n.5158, p.569 –571, 1994.

CALVETE, J. J. The continuing saga of snake venom disintegrins. **Toxicon**, v.62, p.40-49, 2013.

CAMEZ, A. et al. Human platelet-tumor cell interactions vary with the tumor cell lines. **Invasion Metastasis**, v.6, n.6, 321–334, 1986.

CAMERER, E. et al. Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. **Blood**, v.104, n.2, p. 397-401, 2004.

CASTRO, H. C. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.42, n.5, p.321-332, 2006.

CHEN, H. C.; GUAN, J. L. Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.91, n.21, p.10148-10152, 1994.

CHEN, Q. et al. Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.45, p.26602–26605, 1994.

CHEN, Y. P. et al. A point mutation in the integrin $\beta 3$ cytoplasmic domain (S752—>P) impairs bidirectional signaling through $\alpha(\text{IIb})\beta 3$ (platelet glycoprotein IIb-IIIa), **Blood**, v.84, n.6, p.1857–1865, 1994.

CHEN, Y.Q et al. Ectopic expression of platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ in tumor cells from various species and histological origin. **International Journal Cancer**, v.72, n.4, p.642-648, 1997.

CHIANG, H. S.; SWAIM, M. W.; HUANG, T .F. Characterization of platelet aggregation induced by human colon adenocarcinoma cells and its inhibition by snake venom peptides, trigramin and rhodostomin. **British Journal of Haematology**, v.87, n.2, p.325-31, 1994.

COX, D.; BRENNAN, M.; MORAN, N. Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.9, p.804-820, 2010.

CUCÉ, L.; FESTA-NETO, C. **Manual de Dermatologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 658 p.

DAVIES, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v.417, n.6892, p.949-954, 2002.

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

DEMOU, Z. N.; HENDRIX, M. J. Microgenomics profile the endogenous angiogenic phenotype in subpopulations of aggressive melanoma. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.105, n.2, p.562-573, 2008.

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

DÖME, B. et al. Parallel expression of $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ and $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrins in human melanoma cells upregulates bFGF expression and promotes their angiogenic phenotype. **International Journal Cancer**, v.116, p.27-35, 2005.

ELICEIRI, B. P.; HERESH, D. A. The role of αv integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development, **The Journal of Clinical Investigation**, v.103, n.9, p.1227-1241, 1999.

FECHER, L. A., et al. Drug targeting of oncogenic pathways in melanoma. **Hematology/ Oncology Clinics North American**, v.23, n.3, p.599-618, x, 2009.

FELDING-HABERMANN, B. et al. Role of β3 integrins in melanoma cell adhesion to activated platelets under flow, **The Journal of Biological Chemistry**, v.271, n.10, p.5892-5900, 1996.

FELDING-HABERMANN, B. et al. Involvement of integrin αv gene expression in human melanoma tumorigenicity. **The Journal of Clinical Investigation**, v.89, n.6, p.2018-2022, 1992.

FILARDO, E. J. et al. Requirement of the NPXY motif in the integrin beta 3 subunit cytoplasmic tail for melanoma cell migration in vitro and in vivo. **The Journal of Cell Biology**, v.130, n.2, p.441-450, 1995.

FLAHERTY, K. T.; MCARTHUR, G. BRAF, a target in melanoma: implications for solid tumor drug development. **Cancer**, v.116, n.21, p.4902-4913, 2010.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS Journal**, v.275, n.12, p.3016-3030, 2008.

FRIEDLANDER, M. et al. Definition of two angiogenic pathways by distinct α v integrins. **Science**, v.270, n.5241, p.1500-1502, 1995.

FRISCH, S. M. et al. A role for Jun-N-terminal kinase in anoikis; suppression by bcl-2 and crmA. **The Journal of Cell Biology**, v.135, n.5, p.1377-1382, 1996.

FUJII, Y. et al. Crystal structure of Trimestatin, a disintegrin containing a cAdhesion recognition motif RGD. **Journal Molecular Biology**, v. 332, n.5, p.1115-1122, 2003.

GASIC, G. J. et al. Platelet-tumor-cell interactions in mice. The role of platelets in the spread of malignant disease. **International Journal of Cancer**, v.11, n.3, p.704-718, 1973.

GASIC, G. J.; GASIC, T. B.; STEWART, C. C. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.61, n.1, p.46-52, 1968.

GAY, L. J.; FELDING-HABERMANN, B. Contribution of platelets to tumor metastasis. **Nature Review Cancer**, v.11, n.2, p.123-134, 2011.

GLOBOCAN. **Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence**, 2012. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>> Acesso em: 18 fev 2016.

GOUIN-THIBAUT, I.; ACHKAR, A.; SAMAMA, M. M. The thrombophilic state in cancer patients. **ACTA Haematologica**, v.106, n.1-2, p.33-42, 2001.

GOMES, N. et al. Breast adenocarcinoma cell adhesion to the vascular subendothelium in whole blood and under flow conditions: Effects of α v β 3 and α IIb β 3 antagonists. **Clinical & Experimental Metastasis**, v.21, n.6, p. 553-561, 2004.

GIANCOTTI, F. G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. **Science**, v.285, n.5430, p.1028-1032, 1999.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETCHEN, F.R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation and Cancer. **Cell**, v.140, n.6, p.883-899, 2010.

GROUBRAN, H. A. et al. Regulation of tumor growth and metastasis: the role of tumor microenvironment. **Cancer Growth Metastasis**, v.7, p.9-18, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, n.5, p.646-674, 2011.

HAASS, N. K. et al. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Research**, v.18, n.3, p.150-159, 2005.

HEINMÖLLER, E. Tumor cell-induced platelet aggregation in vitro by human pancreatic cancer cell lines. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.30, n.10, p.1008-1016, 1995.

HIEKEN, T. J. et al. Molecular prognostic markers in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. **Cancer**, v.15, n.85, p.375-382, 1999.

HODKINSON, P. S. et al. ECM overrides DNA damage-induced cell cycle arrest and apoptosis in small-cell lung cancer cells through beta1 integrin-dependent activation of PI3-kinase. **Cell Death and Differentiation**, v.13, n.10, p.1776-1788.

HONN, K. et al. The role of platelet cyclooxygenase and lipoxygenase pathways in tumor cell induced platelet aggregation. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.145, n.1, p.384-389, 1987.

HORTON, M. Vitronectin receptor: tissue specific expression or adaptation to culture? **International Journal Experimental of Pathology**, v.71, n.5, p.741-790. 1990.

HOWES, A. L. et al. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, PX-866, é a potent inhibitor of cancer cell motility and growth in three-dimensional cultures. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.6, n.9, p.2505-2514, 2007.

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

HYNES, R. O. The complexity of platelet adhesion to extracellular matrices. **Thrombosis and Haemostasis**, v.66, n.1, p.40-43, 1991.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Tipos de Câncer: Pele Melanoma**, 2016. Rio de Janeiro, Brasil: Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br>> Acesso em: 18 fev 2016.

JALALI, S. et al. Integrin-mediated mechanotransduction requires its dynamic interaction with specific extracellular matrix (ECM) ligands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n.3, p.1042-1046, 2001.

JOYCE, J. A.; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v.9, n.4, p.239-252, 2009.

JURASZ, P. et al. Matrix metalloproteinase 2 in tumor cell-induced platelet aggregation: regulation by nitric oxide. **Cancer Research**, v.61, n.1, p.376–382, 2001.

KAPRON-BRAS, C. et al. Stimulation of tyrosine phosphorylation and accumulation of GTP-bound p21ras upon antibody-mediated $\alpha 2\beta 1$ integrin activation in T lymphoblastic cells. **The journal of Biological Chemistry**, v.268, n.28, p.20701–20704, 1993.

KOH, C. Y.; KINI, R. M. From snake venom toxins to therapeutics--cardiovascular examples. **Toxicon**, v.59, n.4, p.497-506, 2012.

KOISTINEN, P.; HEINO, J. Integrins in Cancer Cell Invasion. **NCBI Bookshelf: Madame Curie Bioscience Database**, 2000.

KOISTINEN, P. et al. $\alpha 5\beta 1$ integrin promotes in vitro and in vivo survival of cells in metastatic melanoma. **International Journal of Cancer**, v.112, n.1, p.61–70, 2004.

KOZLOVA, N. I. et al. Integrin $\alpha 5\beta 3$ promotes anchorage-dependent apoptosis in human intestinal carcinoma cells. **Oncogene**, v.20, n.34, p.4710–4717, 2001.

KREN, A. et al. Increased tumor cell dissemination and cellular senescence in the absence of $\beta 1$ -integrin function. **The EMBO Journal**, v.26, n.12, p.2832-2842, 2007.

KUPHAL, S.; BAUER, R.; BOSSERHOFF, A. K. Integrin signaling in malignant melanoma. **Cancer Metastasis Research**, v.24, n.2, p.195-222, 2005.

LA PORTA, C. A. Drug resistance in melanoma: new perspective. **Current Medicinal Chemistry**, v.14, n.4, p.387-391, 2007.

LABELLE, M.; HYNES, R.O. The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. **Cancer Discovery**, v.2, n.12, p.1091–1099, 2012.

LIAN, L. et al. Inhibition of MCF-7 breast cancer cell-induced platelet aggregation using a combination of antiplatelet drugs. **Oncology Letter**, v.5, n.2, p.675-680, 2013.

LIU, Y. et al., The roles of platelet GPIIb/IIIa and $\alpha 5\beta 3$ integrins during HeLa cells adhesion, migration, and invasion to monolayer endothelium under static and dynamic shear flow. **Journal Biomedicine and Biotechnology**, 2009:829243, 2009.

LONSDORF, A. S. et al. Engagement of α IIb β 3 (GPIIb/IIIa) with α v β 3 integrin mediates interaction of melanoma cells with platelets. **Journal of Biological Chemistry**, v.287, n.3, p.2168-2178, 2012.

LUCENA, S. E. Anti-invasive and anti-adhesive activities of a recombinant disintegrin, r-viridistatin 2, derived from the Prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). **Toxicon**, v.60, n.31-39, 2012.

MALIK, A. B. Pulmonary microembolism. **Physiological Reviews**, v.63, n.3, p.1114-1207, 1983.

MANIOTIS, A. J. et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. **The American Journal of Pathology**, v.155, n.3, p.739-752, 1999.

MARCINKIEWICZ, C. et al. Significance of RGD loop and C-terminal domain of echistatin for recognition of α IIb β 3 and α v β 3 integrins and expression of ligand-induced binding site. **Blood**, v.90, n.4, p.1565-1575, 1997.

MAS-MORUNO, C.; RECHENMACHER, F., KESSLER, H. Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. **Anticancer Agents Medical Chemistry**, v.10, n.10, p.753-768, 2010.

MCLANE, M. A. et al. Viper venom disintegrins and related molecules. **S Proc Soc Exp Biol Med**, v.219, n.2, p.109-119, 1998.

MEHTA, P. Potential role of platelets in the pathogenesis of tumor metastasis. **Blood**, v.63, n.1, p.55-63, 1984.

MIYAMOTO, S. et al. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. **The Journal of Cell Biology**, v.135, n., p.1633-1642, 1996.

MIYAMOTO, S.; AKIYAMA, S. K.; YAMADA, K. M. Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrana function. **Science**, v.267, n.5199, p.883-885, 1995.

MITRA, S. K.; SCHLAEPFER, D. D. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. **Current Opinion in Cell Biology**, v.18, n.5, p.516-523, 2006.

MOHLE, R. et al. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets, **Proc Natl Acad Sci USA**, v.94, n.2, p. 663-668, 1997.

MONTGOMERY, A. M.; REISFELD, R. A.; CHERESH, D. A. Integrin $\alpha\beta 3$ rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.91, n.19, p.8856 – 8860, 1994.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, n.12, p.55-63, 1983.

NASH, G. et al. Platelets and cancer. **The Lancet Oncology**, n.3, v.7, p.425–430, 2002.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Cancer types Melanoma: Anatomy**, 2016. Estados Unidos: National Institutes Health (NIH). Disponível em: <<http://www.cancer.gov>> Acesso em: 18 fev 2016.

NIESWANDT, B. et al. Loss of talin1 in platelets abrogates integrin activation, platelet aggregation, and thrombus formation in vitro and *in vivo*. **The Journal Experimental Medicine**, v.204, n.13, p.3113–3118, 2007.

NIKOLAOU, V. A et al. Melanoma: New insights and new therapies. **Journal Investigative Dermatology**, v.132, n.302, p.854-863, 2012.

NOJIMA, Y. et al. Integrin-mediated cell adhesion promotes tyrosine phosphorylation of p130Cas, a Src homology 3-containing molecule having multiple Src homology 2-binding motifs. **The journal of Biological Chemistry**, v.270, n.25, p.15398–15402, 1995.

ORELLANA, R. et al. Platelets enhance tissue factor protein and metastasis initiating cell markers, and act as chemoattractants increasing the migration of ovarian cancer cells. **BioMed Central Cancer**, v.15, n.1, p.290, 2015.

PALUMBO, J. S. et al. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. **Blood**, v.96, n.10, p.3302–3309, 2000.

PALUMBO, J. S. et al. Spontaneous hematogenous and lymphatic metastasis, but not primary tumor growth or angiogenesis, is diminished in fibrinogen-deficient mice. **Cancer Research**, v.62, n.23, p.6966-6972, 2002.

PALUMBO, J. S. et al. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells, **Blood**, v.105, n.1, p.178-185, 2005.

PARK, C. C.; BISSELL, M. J.; BARCELLOS-HOFF, M. H. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. **Molecular Medicine Today**, v.6, p.324-329. 2000.

PALUNCIC J. et al. Roads to melanoma: Key pathways and emerging players in melanoma progression and oncogenic signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1863, n.4, p.770-784, 2016.

PETCH L. A. et al. Adhesion induced tyrosine phosphorylation of the p130 src substrate. **Journal of Cell Science**, v.108, p.1371-1379, 1995.

PETITCLERC, C. et al. Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. **Cancer Research**, v.59, n.11, p.2724-2730, 1999.

PLOPPER, G. E. et al. Convergence of integrin and growth factor receptor signaling pathways within the focal adhesion complex. **Molecular Biology of the Cell**, v.6, n.10, p.1349-1365, 1995.

PUERSHEL, W. C.; GAWAZ, M.; WORRET, W. I.; RING, J. Immunoreactivity of glycoprotein IIb is present in metastasized but not in nonmetastasized primary malignant melanoma. **The British Journal of Dermatology**, v.135, n.6, p.883-887, 1996.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, v.19, n.11, p.1424-1437, 2013.

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

RÁSÓ, E. et al. Ectopic $\alpha IIb \beta 3$ integrin signaling involves 12-lipoxygenase and PKC mediated serine phosphorylation events in melanoma cells. **Thrombosis and Haemostasis**, v.85, n.6, p.1037-1042, 2001.

RÁSÓ, E et al. Ligand-mimetic anti-alphaIIb beta3 antibody PAC-1 inhibits tyrosine signaling, proliferation and lung colonization of melanoma cells. **Pathology Oncology Research**, v.11, n.4, p.218-223, 2005.

RASTI, M.; BLOSTEIN, M. Delayed immune-mediated thrombocytopenia after re-exposure to Abciximab therapy. **The Canadian Journal of Cardiology**, v.27, n.6, p.869 e13-4, 2011.

REYMOND, N.; d' ÁGUA, B.B.; RIDLEY, A. J. Crossing the endothelial barrier during metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v.13, n.12, p.858-870, 2013.

RIBEIRO, L. C. et al. Recombinant disintegrin targets $\alpha(v) \beta(3)$ integrin and leads to mediator production. **Cell Adhesion & Migration**, v.8, n.1, p.60-65, 2014.

ROLLI, M. et al. Activated integrin $\alpha v\beta 3$ cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. **Proc the Natl Acad Sci USA**, v.100, n.16, p.9482-9487, 2003.

RUFFINI, F. et al. Cilengitide downmodulates invasiveness and vasculogenic mimicry of neuropilin 1 expressing melanoma cells through the inhibition of $\alpha v\beta 5$ integrin. **International Journal of Cancer**, v.136, n.6, p.545-558, 2015.

SAITOH, Y.

Imaging of thrombosis and microcirculation in mouse lungs of initial melanoma metastasis with in vivo cryotechnique. **Microvascular Research**, v.91, p.73-83, 2014.

SCARBOROUGH, R. M. et al. Design of potent and specific integrin a peptide antagonists with high specificity for glycoprotein IIb-IIIa. **The Journal Biological Chemistry**, v.268, n.2, p.1066-1073, 1993.

SEFTOR, R. E. et al. Tumor cell vasculogenic mimicry: from controversy to therapeutic promise. **The American Journal of Pathology**, v.181, n.4, p.1115-1125, 2012.

SHELDRAKE, H. M.; PATTERSON, L. H. Strategies to inhibit tumor associated integrin receptors: rationale for dual and multi-antagonists. **The Journal of Medical Chemistry**, v.57, n.15, p.6301-6315, 2014.

SHEU, J. R. et al. Triflavin, an Arg-Gly-Asp containing snake venom peptide, inhibits aggregation of human platelets induced by human hepatoma cell line. **Thrombosis Research**, v.66, n.6, p.679-691, 1992.

SHISHIDO, S.; BÖNIG, H.; KIM, Y. Role of integrin $\alpha 4$ in drug resistance of leukemia. **Frontiers in Oncology**, v.23, n.4, p.1-10, 2014.

SHATTIL, S. J.; KIM, C.; GINSBERG, M. H. The final steps of integrin activation: the end game. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.11, n.4, p.288-300, 2010.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer statistics. **CA: a cancer journal for clinicians**, v.66, n.1, p.7-30, 2016.

SMALLEY, K. S. Understanding melanoma signaling networks as the basis for molecular targeted therapy. **Journal Investigate Dermatology**, v.130, n.1, p.28-37, 2010.

SMALLEY, K. S.; SONDAK, V. K. Melanoma--an unlikely poster child for personalized cancer therapy. **The New England journal medicine**, v.363, n.9, p.876-878, 2010.

SOENGAS, M. S.; LOWE, S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v.22, n.20, p.3138-3151, 2003.

SUZUKI, M. D. et al. The influence of platelets on the promotion of invasion by tumor cells and inhibition by antiplatelet agents. **Pancreas**, v.29, n.2, p.132-140, 2004.

SWENSON, S.; RAMU, S.; MARKLAND, F. S. Anti-angiogenesis and RGD-containing snake venom disintegrins. **Current Pharmaceutical Design**, v.13, n.28, p.2860-2871, 2007.

TAKLEMARIAM, T. et al. Functional analysis of a recombinant PIII-SVMP, GST-acocostatin; an apoptotic inducer of HUVEC and HeLa, but not SK-Mel-28 cells. **Toxicol**, v.57, n.5, p646-656, 2011.

THAMILSELVAN, V.; CRAIG, D. H., BASSON, M. D. FAK association with multiple signal proteins mediates pressure-induced colon cancer cell adhesion via a Src-dependent PI3K/Akt pathway. **FASEB Journal**, v.21, n.8, p.1730-1741, 2007.

THOMPSON, D. W.; LI, W. W.; MARAGOUDAKIS, M. The clinical manipulation of angiogenesis: pathology, side-effects, surprises, and opportunities with novel human therapies. **The Journal of Pathology**, v.190, n.3, p.130-337, 2000.

TÍMAR, J. et al. Expression and function of the high affinity α IIb β 3 integrin in murine melanoma cells. **Clinical & Experimental Metastasis**, v.16, n.5, p.437-455, 1998.

TRIKHA, M. et al. Role for β 3 integrins in human melanoma growth and survival. **Internation Journal Cancer**, v.101, n.2, p.156-167, 2002.

TSUBAKI, M. et al. Reduction of metastasis, cell invasion, and adhesion in mouse osteosarcoma by YM529/ONO-5920-induced blockade of the Ras/MEK/ERK and Ras/PI3K/Akt pathway. **Toxicology Applied Pharmacology**, v.259, n.3, p.402-410, 2012.

VAN BELLE, P. A. et al. Progression-related expression of beta3 integrin in melanomas and nevi. **Human Pathology**, v.30, n.5, p.562-567, 1999.

VAN DER FLIER, A.; SONNENBERG, A. Function and interactions of integrins. **Cell and Tissue Research**, v.305, n.3, p.285-298, 2001.

VUORI, K. et al. Introduction of p130cas signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: a role for Src family kinases. **Molecular and Cellular Biology**, v.16, n.6, p.2606-13, 1996.

VUORI, K.; RUOSLAHTI, E. Activation of protein kinase C precedes α 5 β 1 integrin-mediated cell spreading on fibronectin. **The Journal of Biological Chemistry**, v.268, n.29, p.21459-21462, 1993.

WOODS, A.; COUCHMAN, J. R. Protein kinase C involvement in focal adhesion formation. **Jornal of Cell Science**, v.101, p.277-290, 1992.

YAN, M.; JURASZ, P. The role of platelets in the tumor microenvironment: From solid tumors to leukemia. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1863, n.3, p.392-400, 2016.

YANG, R. S. et al. Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin. **Toxicon**, v.45, n.5, p.661-669, 2005.

YEBRA, M. et al. Induction of carcinoma cell migration on vitronectin by NF- κ B-dependent gene expression. **Molecular Biology of the Cell**, v.6, n.7, p.841-850, 1995.

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

ZHAO, Y. et al. Tumor $\alpha v \beta 3$ integrin is a therapeutic target for breast cancer bone metastases. **Cancer Research**, v.67, n.12, p.5821-5830, 2007.

ZHAO, F. et al. Roles for GP IIb/IIIa and $\alpha v \beta 3$ integrins in MDA-MB-231 cell invasion and shear flow-induced cancer cell mechanotransduction. **Cancer Letters**, v.344, n.1, p.62-73, 2014.

ZUTTER, M. M. Integrin-mediated adhesion: tipping the balance between chemosensitivity and chemoresistance. **Advances in experimental medicine and biology**, v.608, p.87-100, 2007.