



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Renata Machado Brandão Costa

**Impacto da matriz extracelular derivada de melanoma sobre o perfil
angiogênico de células endoteliais: envolvimento de vias de sinalização
dependentes de integrina**

Rio de Janeiro

2014

Renata Machado Brandão Costa

Impacto da matriz extracelular derivada de melanoma sobre o perfil angiogênico de células endoteliais: envolvimento de vias de sinalização dependentes de integrina

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo

Rio de Janeiro

2014

UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C837 Costa, Renata Machado Brandão.

Impacto da matriz extracelular de melanoma sobre o perfil angiogênicos de células endoteliais: envolvimento de vias de sinalização dependentes de integrina / Renata Machado Brandão Costa. – 2014.

130 f.

Orientadora: Thereza Christina Barja Fidalgo.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Melanoma - Teses. 2. Integrinas - Metabolismo. 3. Neovascularização - Teses. 4. Desintegrinas - Teses. I. Fidalgo, Thereza Christina Barja. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616-006.81

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Renata Machado Brandão Costa

Impacto da matriz extracelular derivada de melanoma sobre o perfil angiogênico de células endoteliais: envolvimento de vias de sinalização dependentes de integrina

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 10 de março de 2014.

Orientadora:

Prof.^a Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Tatiana de Almeida Simão
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Andréa Mariano de Oliveira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Patricia Zancam
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família, fonte da minha alegria e inspiração.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades, pelas pessoas que fazem parte da minha vida e por sempre me guiar e me manter no caminho certo.

À minha família, principalmente minha mãe, meu irmão e meu noivo, pelos bons exemplos de perseverança, esperança, respeito, caráter e humildade, além do amor, carinho e apoio em todos os momentos da minha vida.

Ao meu pai, por ter me deixado um exemplo de vida a ser seguido, além de todo o incentivo, investimento, empenho e preocupação com a minha formação profissional e pessoal. Tenho certeza que você estaria comemorando, fortemente, mais essa conquista.

À Prof^a. Dr^a. Thereza Christina Barja-Fidalgo pela oportunidade de desenvolver esse trabalho em seu laboratório, pelos ensinamentos, paciência e atenção.

Ao Prof. Dr Edward Helal por me co-orientar, sempre com muita paciência, dedicação, conselhos, incentivos e com boa vontade em me ensinar.

À Prof^a. Dr^a. Iolanda Margherita Fierro por aceitar revisar a minha dissertação.

A Renata, Genilson e Gabi pela participação fundamental nesse trabalho, para o bom andamento dos experimentos.

A todos os amigos do laboratório pela boa convivência, pelos momentos de alegria e descontração, que muitas vezes me ajudaram a esquecer diversos problemas e superar frustrações.

Aos amigos do LabAngio, por toda a ajuda e acolhida.

Às minhas amigas de infância, Kamilla e Daniele, pela amizade, amor, paciência, momentos felizes e “injeções” de ânimo.

Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir
entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque
descobri, no caminho incerto da vida, que o mais
importante é o decidir.

Cora Coralina

RESUMO

COSTA, Renata Machado Brandão. *Impacto da matriz extracelular derivada de melanoma sobre o perfil angiogênico de células endoteliais*: envolvimento de vias de sinalização dependentes de integrinas. 2014. 130 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

A progressão tumoral cria um microambiente que influencia a plasticidade, migração e invasão de células vizinhas, levando à formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, um processo conhecido como angiogênese. Esse processo depende da produção de fatores de crescimento, pelas células tumorais, que estimulam o crescimento de novos vasos sanguíneos. Porém, a adesão à matriz extracelular (MEC) também é importante para regular a sobrevivência, proliferação e motilidade da célula endotelial, durante a angiogênese. Integrinas são as principais moléculas de adesão responsáveis pelas interações célula-matriz, e pela transdução de sinais que regulam a forma, sobrevivência e proliferação celular. Integrinas podem também ativar receptores tirosina quinase independentemente da sua atividade quinásica intrínseca, como o VEGFR2, através de um processo conhecido como transativação. Assim, é possível propagar as sinalizações intracelulares para garantir o crescimento, sobrevivência e diferenciação celular durante a angiogênese normal ou patológica. Neste estudo, investigamos os efeitos das desintegrinas, que são ligantes seletivos de integrinas, alterando suas funções. Por esse motivo, as desintegrinas se tornaram importantes para o desenvolvimento de terapias anti câncer. Nesse trabalho, avaliamos as vias de sinalização intracelulares envolvidas nas interações entre a matriz extracelular tumoral e as células endoteliais, e como essas interações podem levar à angiogênese. Mostramos que a matriz tumoral, obtida da linhagem celular de melanoma humano (MV3), apresentava diferenças estruturais, comparada à matriz não tumoral, obtida a partir da linhagem celular de melanócito humano (NGM). Observamos que, diferentemente da MEC da NGM, a MEC da MV3 aumentou a polimerização de F-actina nas HMEC1, corroborando com o aumento da fosforilação de AKT e FAK. Mostramos um aumento na fosforilação de VEGFR2, além de um aumento da associação de FAK com c-Src, nas HMEC1 cultivadas 24 horas sobre a MEC da MV3. Finalmente, vimos que desintegrinas reduziram a polimerização e distribuição de F-actina nas HMEC1 cultivadas sobre a MEC da MV3, e inibiram a migração de células endoteliais plaqueadas sobre a MEC tumoral, sugerindo um importante papel na prevenção da metástase e do desenvolvimento tumoral. Esses resultados sugerem que a matriz tumoral modifica o comportamento da célula endotelial, ativando vias de sinalização dependentes de integrinas que estão relacionadas a eventos importantes no processo angiogênico. Essas alterações provavelmente são potencializadas pela ativação do VEGFR2.

Palavras-chave: Melanoma. Integrinas. Angiogênese. Desintegrinas.

ABSTRACT

COSTA, Renata Machado Brandão. *Impact of melanoma-extracellular matrix on the angiogenic profile of endothelial cells: involvement of integrin-dependend pathways*. 2014. 130 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Tumor progression creates a microenvironment that influences plasticity, migration and invasion of neighboring cells and triggers the formation of new blood vessels from preexisting blood vessels, a process known as angiogenesis. This process depends on the production of growth factors by tumor cells that stimulate new blood vessel growth and survival. But, adhesion to the extracellular matrix (ECM) is also important to regulate survival, proliferation and motility of endothelial cells during angiogenesis. Integrins are the major protein adhesion molecules responsible for cell-matrix interactions and transduction of signals that regulate cell shape, survival and proliferation. Integrins can also crosstalk with tyrosine kinase receptors, like VEGFR2, activating this receptor independent from the intrinsic kinase activity. Thus, it is possible to propagate downstream signals to ensure cell growth, survival and differentiation in normal and pathological angiogenesis. In our study, we investigated the effects of disintegrins, wich are selective ligands for integrins, changing the functions of the integrins. Because of this, these molecules have become important for cancer therapy development. Here, we evaluated the intracellular signaling pathways involved in interactions between tumor-derived extracellular matrix and endothelial cells and how these interactions may impact events associated with tumor angiogenesis. We showed that tumor-derived extracellular matrix, obtained from the human melanoma cell line (MV3), presents structural differences, compared with normal ECM, obtained from the human melanocyte cell line (NGM). We observed that, differently from NGM ECM, MV3 ECM increase F-actin polymerization on HMEC1, corroborating with the increase in phosphorylation of AKT and FAK. We also showed an increase in phosphorylated VEGFR2, and an increase FAK association with c-Src, on HMEC1 cultured 24 hours on MV3 ECM. Finally, we saw that desintegrins reduced F-actin polymerization and distribution in HMEC1 cultured on MV3 ECM. And yet, these disintegrins were able to inhibit the migration of the endothelial cells plated on tumoral ECM. Taken together, these data suggest that tumor matrix change endothelial cell behavior, activating integrin-dependend signaling pathways which are related to important events on angiogenic process. These changes probably are potentiated by VEGFR2 activation.

Keywords: Melanoma. Integrins. Angiogenesis. Disintegrins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	As principais características do câncer.....	17
Figura 2 -	Desenho de um melanócito.....	21
Figura 3 -	Fases de crescimento do melanoma.....	22
Figura 4 -	Adesão célula-célula de melanócitos e melanoma.....	23
Figura 5 -	Fatores angiostáticos e angiogênicos.....	26
Figura 6 -	O processo angiogênico.....	26
Figura 7 -	Hipóxia e a indução da angiogênese.....	27
Figura 8 -	Mecanismos reguladores da angiogênese e linfogênese.....	28
Figura 9 -	Representação esquemática da estrutura das integrinas.....	31
Figura 10 -	Sinalização mediada por integrinas.....	34
Figura 11 -	Microambiente tumoral.....	44
Figura 12 -	Desenho esquemático do processo de obtenção da matriz extracelular.....	49
Figura 13 -	Imunomarcagem das proteínas fibronectina, tenascina-C e laminina na MEC da MV3 e da NGM.....	57
Figura 14 -	Microscopia eletrônica de varredura da MEC da MV3 e da NGM.....	58
Figura 15 -	Fosforilação de FAK nas células endoteliais sobre as diferentes matrizes.....	60
Figura 16 -	Marcação de F-actina nas células endoteliais sobre as diferentes matrizes.....	61
Figura 17 -	Fosforilação de AKT nas células endoteliais sobre as diferentes matrizes.....	62
Figura 18 -	Expressão de mRNA para VEGFR1 e VEGFR2 nas HMEC1 sobre as diferentes matrizes.....	63
Figura 19 -	Fosforilação de VEGFR2 nas HMEC1 sobre as diferentes matrizes.....	64
Figura 20 -	Associação de FAK-cSrc nas HMEC1 sobre diferentes matrizes.....	65
Figura 21 -	Marcação de F-actina das células endoteliais, pré-tratadas com	

	desintegrinas, sobre as diferentes matrizes.....	67
Figura 22 –	Número de células endoteliais aderidas contadas no sobrenadante da citoquímica.....	70
Figura 23 –	Marcação de F-actina das células endoteliais, pós-tratadas com desintegrinas, sobre as diferentes matrizes.....	72
Figura 24 -	Efeito das desintegrinas sobre a migração das células endoteliais sobre as diferentes matrizes.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativa do número de casos novos, em homens, Brasil, 2014.....	18
Tabela 2 - Estimativa do número de casos novos, em mulheres, Brasil, 2014.....	19
Tabela 3 - Classificação de integrinas de acordo com a subunidade β	32
Tabela 4 - Dados das desintegrinas utilizadas nos experimentos.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAM	Proteína com domínios metaloprotease e desintegrina
AKT	<i>Serine/threonine-specific protein kinase</i>
BCA	Ácido bicinconínico
bFGF	Fator básico de crescimento de fibroblasto
BSA	Albumina sérica bovina
CREB	“cAMP response element-binding”
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ECD	Ácido glutâmico-glicina-ácido aspártico
EGF	Fator de crescimento epidermal
ERK	Quinase regulada por estímulo extracelular
FAK	Quinase de adesão focal
FBS	<i>Fetal serum buffer</i>
FITC	Isotiocianeto fluoresceína
GTPases	Guanosina trifosfatase
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
HEPES	Ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico)
HMEC	Linhagem celular de endotélio de microvasculatura humana
IL	Interleucina
IP ₃	Inositol 1,4,5 trifosfato
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloprotease
MV3	Linhagem celular de melanoma humano metastático
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PI3K	Fosfatidil inositol-3 quinase
PIGF	Fator de crescimento placentário
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PVDF	Polivinilideno difluorido
RGD	Sequência arginina-glicina-ácido aspártico

SDS	Dodecilssulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
TCA	Ácido tricloroacético
TGF	Fator de crescimento tumoral
TNF	Fator de necrose tumoral
T-PBS	<i>Tween-phosphate buffered saline</i>
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	15
1	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
1.1	O câncer.....	16
1.2	Melanoma.....	18
1.2.1	Progressão do melanoma.....	20
1.3	Célula endotelial.....	24
1.3.1	Angiogênese.....	25
1.3.2	VEGF e o seu receptor.....	29
1.4	Integrinas e sinalização intracelular.....	31
1.5	Desintegrinas.....	36
1.5.1	ADAM (A <i>Disintegrin And Metalloproteinase</i>).....	37
1.5.2	DisBa-01.....	38
1.5.3	Eristostatina.....	39
1.6	Matriz extracelular.....	39
1.7	Microambiente tumoral.....	42
2	OBJETIVOS.....	46
2.1	Objetivo geral.....	46
2.2	Objetivos específicos.....	46
3	METODOLOGIA.....	47
3.1	Desintegrinas utilizadas.....	47
3.2	Linhagens celulares.....	47
3.3	Cultura de células.....	47
3.4	Contagem de células.....	48
3.5	Obtenção da matriz extracelular.....	48
3.6	Imunomarcção da matriz extracelular.....	49
3.7	Análise estrutural da MEC por microscopia eletrônica de varredura.....	50
3.8	Marcação de F-actina nas células HMEC1 sobre as diferentes matrizes.....	50

3.9	Eletroforese e western blotting	51
3.10	Imunoprecipitação	52
3.11	Expressão de mRNA (qRT-PCR)	53
3.12	Fosforilação do receptor do VEGF (VEGFR2)	54
3.13	<i>Wound healing</i>	55
3.14	Tratamento estatístico	55
4	RESULTADOS	56
4.1	Organização estrutural das matrizes obtidas das células MV3 e NGM	56
4.2	Efeito da MEC da MV3 sobre a ativação de vias dependentes de integrinas nas HMEC1	59
4.3	Efeito da MEC da MV3 sobre a expressão de VEGFR1 e VEGFR2 nas HMEC1	63
4.4	Efeito da MEC da MV3 sobre a associação de c-Src-FAK nas células endoteliais	65
4.5	Efeito das desintegrinas sobre a organização de F-actina nas HMEC1 sobre a MEC tumoral	66
4.6	Efeito das desintegrinas na migração da HMEC1 sobre as diferentes matrizes	71
5	DISCUSSÃO	74
	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	82
	APÊNDICE - Impact of tumor extracellular matrix on the functions of endothelial cells and their association with tumor-associated angiogenesis (Artigo científico)	96

INTRODUÇÃO

A progressão tumoral gera um microambiente inflamatório, criado por fatores de crescimento, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), e citocinas que modulam diferentes funções das células vizinhas, como, por exemplo, as células endoteliais (Mueller e Fusenig, 2004). O estroma tumoral é capaz de aumentar a migração, proliferação e invasão das células endoteliais, facilitando a formação de novos vasos que contribuirão para o aporte de oxigênio e nutrientes para essa massa de células tumorais, que está em constante crescimento (Hanahan e Weinberg, 2011).

As células tumorais são capazes de secretar metaloproteases de matriz que remodelam a matriz extracelular (MEC), modificando sua composição para facilitar eventos celulares que favoreçam o crescimento tumoral (Marastoni e col., 2008). A adesão da célula endotelial à MEC tumoral, um dos componentes do microambiente tumoral, é importante para regular a sobrevivência, proliferação e motilidade dessas células, durante a angiogênese (Barkan e col., 2010).

A sinalização intracelular dependente de integrina (responsáveis pelas interações célula-matriz) regula a forma, sobrevivência e proliferação das células endoteliais (Oliva e col., 2007). Estudos recentes mostram que as integrinas também são capazes de ativar receptores tirosina quinase envolvidos com a neovascularização, como o VEGFR2, de maneira independente da sua atividade quinásica intrínseca, levando à ativação de vias intracelulares que reforçam eventos celulares que levam à angiogênese (Somanath e col., 2009).

As desintegrinas são ligantes seletivos de integrinas que podem alterar respostas celulares dependentes dessas integrinas. Portanto, vem sendo utilizadas como ferramentas importantes na regulação da transdução de sinais intracelulares que culminam em diversos eventos, dentre eles a angiogênese. Por esse motivo, as desintegrinas se tornaram importantes alvos de estudo para o desenvolvimento de terapias que visam à inibição do crescimento tumoral (Selistre-de-Araujo e col., 2010).

A interação da matriz tumoral com as células endoteliais e a sua consequência na angiogênese tumoral ainda é pouco estudada. A identificação de moléculas que sejam ligantes seletivos de integrinas e a compreensão dos mecanismos moleculares e celulares que são afetados a partir dessas interações é fundamental para o desenvolvimento de moléculas anti-cancer.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 O câncer

O termo câncer é utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento celular desordenado, podendo invadir diferentes tecidos (INCA).

No Brasil, a partir de 1960, seguindo uma tendência mundial, as doenças infecciosas deixaram de ser a principal causa de morte, sendo substituídas pelas doenças do aparelho circulatório e neoplasias. Essa progressiva ascensão da incidência e da mortalidade por doenças crônico-degenerativas tem como principal fator o envelhecimento da população, resultante do intenso processo de urbanização e das ações de promoção e recuperação da saúde (INCA). Atualmente, as neoplasias malignas constituem importante causa de doença e morte no Brasil. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou, para o ano 2030, 27 milhões de casos incidentes e 17 milhões de mortes por câncer. Por isso, nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial (INCA).

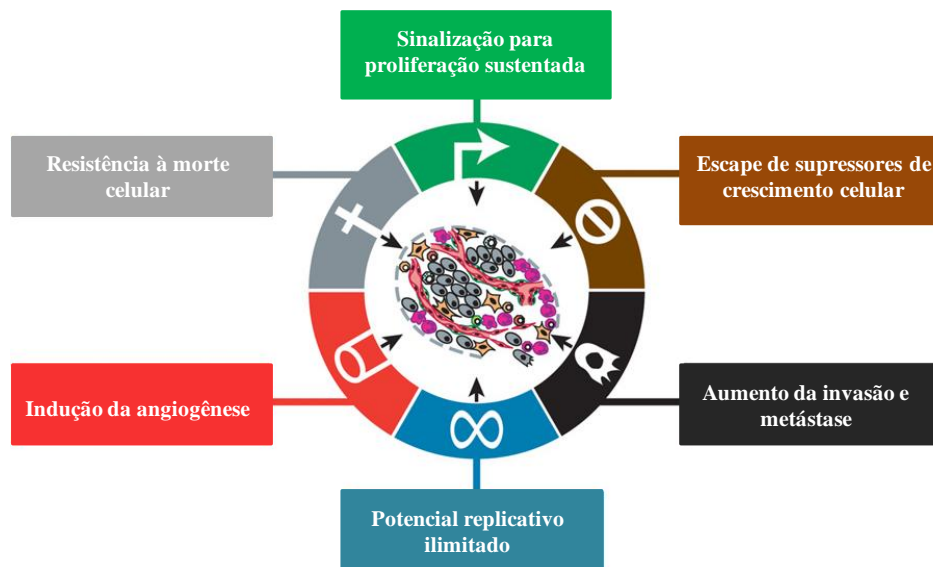
As causas do câncer estão relacionadas a fatores de risco que podem ser externos, como o tabagismo, alcoolismo, hábitos alimentares e exposição à radiação solar ou radioatividade. Os fatores externos são responsáveis por 80% de todos os casos relacionados ao câncer. Além disso, fatores intrínsecos, como mutações herdadas e condições imunes contribuem em 20% dos casos. Esses fatores podem agir associados ou não para iniciar o processo de carcinogênese (Jemal e col., 2007; Garcia e col., 2007).

A elevada proliferação das células tumorais leva à formação de uma massa anormal de tecido (tumor) que excede os limites anatômicos do tecido normal. Os tumores podem ser benignos, geralmente autolimitados em seu crescimento e não invadem tecidos adjacentes, ou malignos, que são capazes de invadir outros tecidos (El-Bacha e col., 2003). A invasão, em tumores malignos, está ligada a um conjunto de alterações que são essenciais para o desenvolvimento da célula tumoral (Figura 1), como a insensibilidade a sinais que interrompam o crescimento celular, aumento da resistência à morte celular, potencial de replicação ilimitado, angiogênese sustentada, e metástase (Hanahan e Weinberg, 2000; Hanahan e Weinberg, 2011). Dessa forma, a progressão tumoral modifica o microambiente no entorno para um “estado ativado” através da liberação de diversos fatores que ativam vias de

sinalização nas células adjacentes que contribuem com o crescimento tumoral (Pietras e Ostman, 2010).

O desenvolvimento tumoral inclui três etapas: iniciação, promoção e progressão. A iniciação consiste em alterações permanentes no genótipo celular ocasionadas por mutações pontuais, ampliações ou deleções de genes. Essas mudanças podem levar à perda da proteção contra transformações celulares, aumentando a susceptibilidade de formação do câncer. A fase de promoção é um processo de amplificação das células que tiveram seu genótipo alterado (Ordman e col., 1985; Martin de Civetta e Civetta, 2011). A progressão tumoral envolve, além da expansão clonal das células mutadas, dependendo da agressividade das células, a ocorrência de metástase. Isso porque, nessa etapa, as células diminuem a sua adesão às células vizinhas e à matriz extracelular (MEC), deixando o tecido de origem para invadir outros tecidos, através de vasos sanguíneos ou linfáticos, onde irão se estabelecer e proliferar (Mareel e Leroy, 2003; Martin de Civetta e Civetta, 2011).

Figura 1 – As principais características do câncer



Legenda: As seis principais características do câncer propostas.

Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011, f. 647.

1.2 Melanoma

O melanoma é o tipo de câncer de pele menos frequente (apenas 4%) dentre todas as neoplasias de pele. No entanto, sua letalidade é a mais elevada, principalmente pela alta possibilidade de metástase (INCA). O melanoma é originado de mutações, randômicas ou não, em genes importantes para a diferenciação das células produtoras de pigmento: os melanócitos (Chin, 2003). A OMS estima que anualmente ocorram cerca de 130 mil novos casos deste tipo de câncer no mundo (Lasithiotakis e col., 2010). A maior ocorrência de casos de melanoma é observada na Austrália e em regiões onde a população caucasiana é predominante, em contrapartida essa incidência é menor em populações asiáticas e africanas (Sortino-Rachou e col., 2011).

As estimativas do INCA (Instituto Nacional de Câncer) para o Brasil, em 2014, apontam a ocorrência de aproximadamente 576.580 novos casos de câncer, dentre os quais, 5.890 novos casos de melanoma (2.960 em homens e 2.930 em mulheres) (Tabelas 1 e 2). Tal fato vem atraindo a atenção das autoridades de saúde pública, para o desenvolvimento de muitas campanhas de prevenção e diagnóstico precoce do câncer (INCA).

Tabela 1 – Estimativa do número de casos novos, em homens, Brasil, 2014

Localização Primária	Casos Novos	%
Próstata	68.800	22,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%
Estômago	12.870	4,3%
Cavidade Oral	11.280	3,7%
Esôfago	8.010	2,6%
Laringe	6.870	2,3%
Bexiga	6.750	2,2%
Leucoemias	5.050	1,7%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%
Linfoma não-Hodgkin	4.940	1,6%
Pele Melanoma	2.960	1,0%
Linfoma de Hodgkin	1.300	0,4%
Glândula Tireoide	1.150	0,4%
Todas as Neoplasias sem pele*	203.930	
Todas as Neoplasias	302.350	



Fonte: MS/INCA/ Estimativa de Câncer no Brasil, 2013.

Tabela 2 – Estimativa do número de casos novos, em mulheres, Brasil, 2014

Localização Primária	Casos Novos	%
Mama feminina	57.120	20,8%
Cólon e Reto	17.530	6,4%
Colo do útero	15.580	5,7%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Estômago	7.520	2,7%
Corpo do útero	5.900	2,2%
Ovário	5.680	2,1%
Linfoma não-Hodgkin	4.850	1,8%
Leucemias	4.320	1,6%
Sistema Nervoso Central	4.130	1,5%
Cavidade Oral	4.010	1,5%
Pele Melanoma	2.930	1,1%
Esôfago	2.770	1,0%
Bexiga	2.190	0,8%
Linfoma de Hodgkin	880	0,3%
Laringe	770	0,3%
Todas as Neoplasias sem pele*	190.520	
Todas as Neoplasias	274.230	



Fonte: MS/INCA/ Estimativa de Câncer no Brasil, 2013.

Assim como outros tipos de câncer, além dos fatores genéticos, fatores ambientais também estão envolvidos no desenvolvimento do melanoma. Os fatores de risco desse tipo de câncer incluem: a sensibilidade da pele, principalmente de cor clara, a presença de nevos displásicos e a exposição excessiva ao sol (Sortino-Rachou e col., 2011). Outros fatores relacionados à ocorrência de melanoma são: idade, imunodepressão e pré-disposição genética (Rhodes e col., 1987). Portanto, indivíduos de qualquer etnia e mesmo as pessoas que não se expuseram de modo excessivo ao sol, durante a vida, podem desenvolver o melanoma (Sortino-Rachou e col., 2011). Além disso, a incidência deste tumor é influenciada por parâmetros geográficos como altitude e latitude, que influenciam na quantidade de radiação ultravioleta do sol recebida no local (Eide e Weinstock, 2005; INCA).

Quando o melanoma é detectado em estágio inicial, o prognóstico pode ser considerado bom e geralmente é curável (INCA). Nesses casos, o principal tratamento é a cirurgia para a retirada do câncer. Outros tipos de tratamentos como a radioterapia e a quimioterapia também são utilizados, porém são ineficientes em pacientes que já apresentam metástase. O desafio, portanto, tem sido regular as células tumorais que conseguem chegar à corrente sanguínea. Por esse motivo, há uma crescente necessidade de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do melanoma (Emmett e col., 2011).

1.2.1 Progressão do melanoma

Os melanócitos humanos são derivados da crista neural, durante o desenvolvimento embrionário. Localizam-se na camada basal da epiderme, enviando processos dendríticos que fazem contato com os queratinócitos nas camadas basal e superficial da epiderme (Figura 2). Após a síntese da melanina, pelos melanócitos, ocorre o transporte da mesma para os queratinócitos adjacentes, através de organelas conhecidas como melanossomas, conferindo termoregulação e fotoproteção à pele (Lin e Fisher col., 2007).

O crescimento dos melanócitos é controlado por queratinócitos, através de comunicação extracelular, via fatores de crescimento, componentes da MEC e sistemas de adesão célula-célula dependentes de E-caderina, contribuindo para a homeostase dos melanócitos (Haass e col., 2005).

A radiação ultravioleta é invisível aos olhos humanos e causa queimaduras na pele e danos ao DNA celular. Dessa forma, a vida nesse planeta só é possível graças a uma camada de ozônio que engloba a Terra e filtra grande parte desse espectro de radiação UV. Porém, essa radiação também é fundamental para a saúde humana, ajudando, por exemplo, na formação de vitamina D (Svobodová e col., 2012).

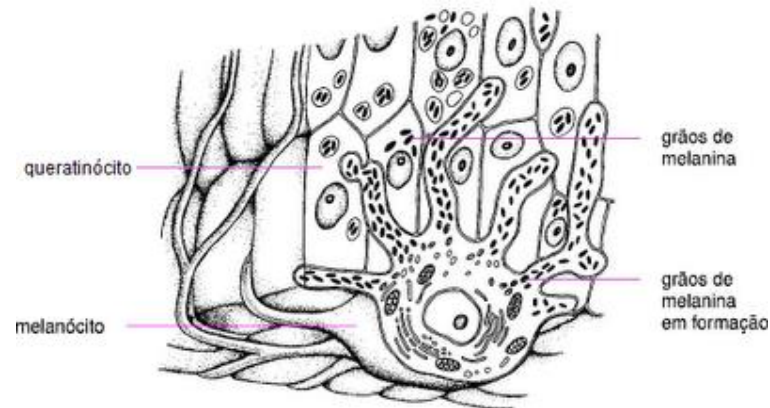
A radiação solar é composta por três tipos de radiação ultravioleta: UVA, UVB e UVC. A radiação do tipo UVC (200-280 nm) fica retida pela camada de ozônio, mas a UVA (320-400 nm) pode alcançar camadas mais profundas da derme. De 19 a 50% da radiação UVA podem alcançar os melanócitos, estimulando a produção de melanina, o que resulta em uma proteção transitória contra injúrias geradas após exposição à radiação UVB (Costin e Hearing col., 2007). Atualmente, sabe-se que a radiação UVA causa danos indiretos ao DNA, através da produção de radicais livres e de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Svobodová e col., 2012).

A radiação UVB (280-320 nm), durante os períodos em que a radiação solar não é nociva ao homem, está envolvida na produção de peróxido de hidrogênio, necessário para a ativação do fator de crescimento epidérmico e sobrevivência celular (Peus e col., 1998). Em contrapartida, o excesso de radiação do tipo UVB pode causar danos diretamente ao DNA, induzindo a geração de ROS (Heck e col., 2010).

Diferentemente da radiação UVA, a UVB causa queimaduras na pele, sendo, portanto, o principal alvo de protetores solares. Por esse motivo, a eficácia dos protetores solares é bastante discutida na literatura, já que a maioria protege apenas contra queimaduras do sol,

provocadas pelos raios UVB, mas não protege contra a radiação UVA que, apesar de não queimar a pele, também pode causar danos indiretos ao DNA, podendo desencadear o melanoma (Garland e col., 1993; Stephens e col., 2011).

Figura 2 – Desenho de um melanócito



Legenda: Seus prolongamentos citoplasmáticos se insinuam entre as células da camada basal da epiderme. Esses prolongamentos estão cheios de grãos de melanina, que são transferidos para o citoplasma dos queratinócitos.

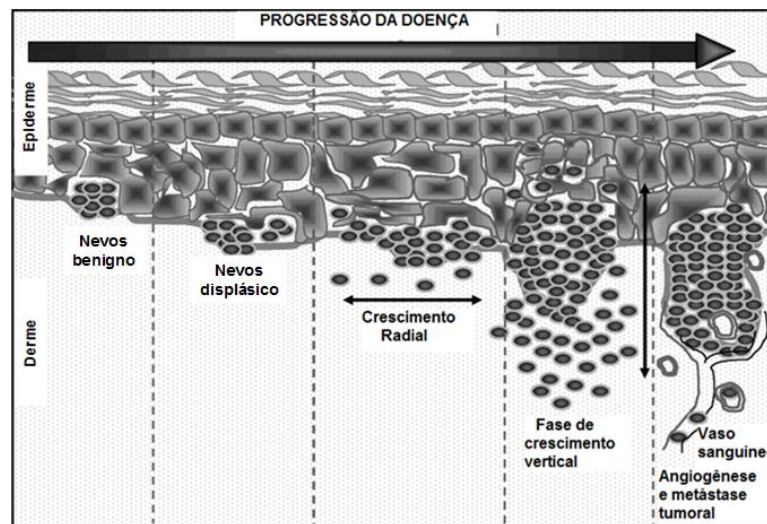
Fonte: Junqueira e Carneiro, 2008, Ed. 11, f. 363.

A transição de lesões na pele de benignas para malignas geralmente ocorre por mudanças na expressão e funções de oncogenes ou supressores de tumor, assim como modificação da adesão entre os melanócitos e a MEC (Li e col., 2002, Mahabeleshwar e Byzova col., 2007). Todas essas modificações fazem com que os melanócitos normais comecem a proliferar de modo desordenado, formando o nevo benigno. A rápida proliferação dos melanócitos transformados forma o nevo displásico, assimétrico com bordas irregulares, que é seguido por uma rápida fase de crescimento radial, caracterizada como intraepidermal (Mahabeleshwar e Byzova col., 2007; Ria e col., 2010). Nessa fase, as células transformadas dependem de fatores de crescimento exógenos, provenientes dos queratinócitos, e são incapazes de crescerem independentemente (Hsu e col., 2002).

A última fase do crescimento do melanoma é a fase vertical, também chamada de fase de invasão da derme (Figura 3). Nessa fase, as células conseguem se desenvolver independentemente dos queratinócitos, e são tumorigênicas e altamente metastáticas em pacientes e em modelos experimentais em animais (Mahabeleshwar e Byzova col., 2007). A capacidade invasiva das células transformadas (melanoma) se dá pela perda de contato entre o melanócito transformado e o queratinócito. Isso acontece pela perda da expressão de E-caderina, pelos melanócitos, que é um receptor essencial para a comunicação melanócito-

queratinócito (Sarray e col., 2009). Além disso, os melanócitos alterados aumentam a expressão de receptores, como a N-caderina, importantes para as interações das células de melanoma entre si e com outros tipos celulares, como fibroblastos e células endoteliais. Essas interações através de N-caderinas são mais fracas e, portanto, levam ao aumento da migração do melanoma. E ainda, o melanoma é capaz de modificar a sua ancoragem à MEC, por alterar a produção de seus componentes (Figura 4). Porém, os mecanismos que iniciam todas essas alterações ainda são desconhecidos (Haass e col., 2005).

Figura 3 – Fases de crescimento do melanoma



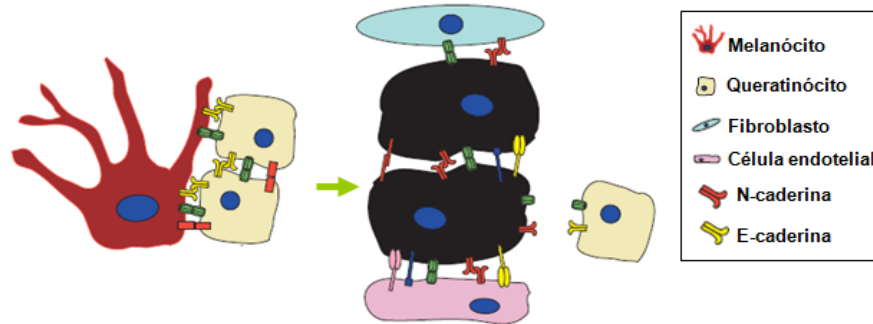
Legenda: A proliferação aberrante de melanócitos normais leva a formação de nevos benignos. A rápida proliferação dos melanócitos transformados forma um nevo displásico, assimétrico com bordas irregulares. Isso é seguido por uma rápida fase de crescimento radial, caracterizada como intraepidermal. A última fase do crescimento do melanoma é a fase vertical, também chamada de fase de invasão da derme.

Fonte: Adaptado de Mahabeleshwar e Byzova, 2007, f. 13.

Como a célula endotelial normalmente expressa N-caderina para se comunicar com outros tipos celulares, como pericitos e células musculares lisas, nessa fase, ela também irá interagir com as células tumorais de melanoma que passaram a expressar esse tipo de caderina (Wheelock e col., 2008). Essa nova interação é responsável pelo aumento, nessa última etapa, da atividade angiogênica, estimulada pelo contato das células endoteliais com as células transformadas, e também, pela produção de fatores de crescimento e mitógenos pelo melanoma (Ria e col., 2010). Warren e Shubik (1966) foram os primeiros a descrever esse aumento da atividade angiogênica, a partir do transplante de células de melanoma na bochecha de hamsters.

A habilidade que as células de melanoma têm de expressar genes associados ao endotélio, induzindo a angiogênese, e de formar uma MEC que facilita a tumorigênese, por ser rica em fatores indutores da vasculogênese, vem sendo muito estudada (Emmett e col., 2011).

Figura 4 – Adesão célula-célula de melanócitos e melanoma



Legenda: Melanócitos aderem a queratinócitos, via E-caderina, permitindo a comunicação entre as duas células (lado esquerdo). No melanoma há uma perda de expressão de E-caderina pelo melanócito. Essas células transformadas passam a interagir entre si, com células endoteliais e fibroblastos, através da ligação com N-caderina.

Fonte: Adaptado de Haass e col., 2005, f.151.

Quando as células tumorais do melanoma chegam à corrente sanguínea ou linfática, que circundam a massa tumoral, conseguem colonizar outros tecidos, que se tornam sítios secundários, como pulmão, fígado e cérebro, iniciando o processo de metástase, que rapidamente leva ao óbito (Mahabeleshwar e Byzova, 2007).

No processo de metástase as células tumorais adquirem a habilidade de se dissociarem de um tumor primário, ultrapassar a parede dos vasos e invadir tecidos adjacentes (Kurschat e Mauch col., 2000). A metástase é um processo que envolve uma sequência de eventos que compreendem: o descolamento das células do tumor primário, facilitado pela perda de expressão da E-caderina, a migração e invasão no estroma local, o intravasamento e trânsito através dos capilares sanguíneos na periferia do tumor, acessando a corrente sanguínea. Na corrente sanguínea as células podem se ancorar no leito vascular do tecido alvo, extravasar, e, por fim, migrar e aderir, formando micrometástases. As células invasivas podem proliferar no novo tecido, ou permanecer em dormência por períodos variáveis (Geho e col., 2005; Horimoto e col., 2012).

1.3 Célula endotelial

O endotélio vascular recobre a superfície interna dos vasos sanguíneos e linfáticos no organismo adulto. Esses vasos formam uma complexa rede que suprirá as necessidades de oxigênio e nutrientes dos tecidos (Folkman, 2004; Franses e col., 2011). As células endoteliais estão, normalmente, em estado quiescente, mantendo contato entre si, com pericitos e com células musculares lisas presentes na túnica íntima, conferindo contratilidade para os vasos, o que é importante na regulação do fluxo sanguíneo (Collett e Canfield, 2005; Karamysheva, 2008).

As células endoteliais se desenvolvem a partir do hemangioblasto, de origem mesodérmica. Os hemangioblastos podem dar origem aos angioblastos, células precursoras endoteliais. A ativação do receptor tirosina quinase, FLK-1 (do inglês Fetal Liver Kinase 1), nos angioblastos determina o direcionamento para a diferenciação endotelial. A formação do plexo vascular, a partir dos angioblastos, durante o desenvolvimento embrionário chama-se vasculogênese (Bertolini e col., 2006, Karamysheva, 2008). As células endoteliais participam da formação de novas ramificações de vasos, a partir de outro vaso pré-existente, processo conhecido como angiogênese (Folkman, 2004; Mierke, 2012).

O endotélio é mais do que uma camada celular inerte que recobre a parede dos vasos e que auxilia no aporte de substâncias para o tecido. Ele também está envolvido em diversos processos fisiológicos e patológicos, como, por exemplo, na inflamação e no câncer (Mierke, 2012).

A ativação do endotélio por estímulos externos ou pelo contato com a MEC expõe diferentes receptores em sua superfície (Rajendran e col., 2013), facilitando a adesão e diapedese de leucócitos em situações inflamatórias, além de permitir a angiogênese em situações fisiológicas e patológicas, como no desenvolvimento embrionário e no câncer, respectivamente (Pilorget e col., 2007).

Trabalhos recentes mostraram que as células do melanoma são capazes de adotar propriedades semelhantes às das células endoteliais, e organizar redes vasculares frágeis, com a participação de VE-caderina e laminina, que tem sua expressão aumentada no melanoma. Esses vasos contribuem para a irrigação da massa tumoral e pioram o prognóstico desse tipo de câncer de pele. Esse evento é conhecido como mimetismo vascular (Hendrix e col., 2003; Szala e Jarosz, 2011).

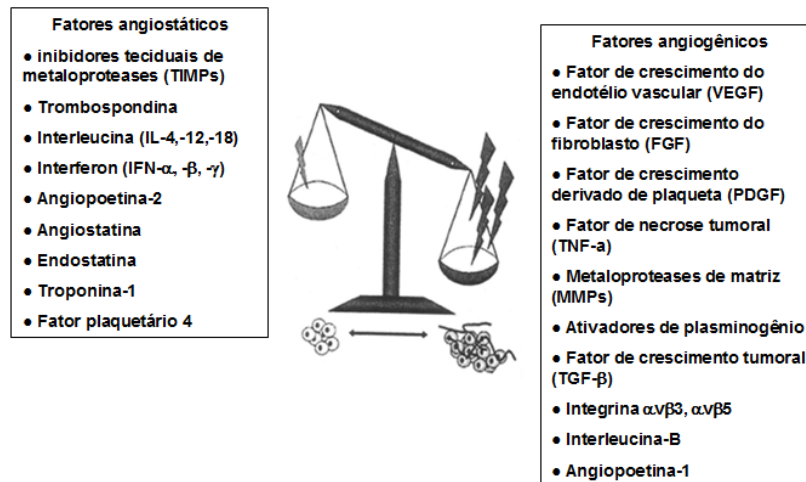
1.3.1. Angiogênese

O processo da angiogênese é definido como a formação de novos vasos a partir de outros vasos pré-existentes (Folkman, 2004; Emmett e col., 2011), e é fundamental durante o período embrionário, na cicatrização e durante o ciclo menstrual (Pilorget e col., 2007; Emmett e col., 2011). Em quadros onde existe uma deficiência na formação de novos vasos, o crescimento inadequado de capilares impede a circulação sanguínea apropriada, levando à morte tecidual (Powell, 1999).

O desenvolvimento vascular é um processo complexo que envolve múltiplas etapas e diferentes tipos celulares que devem interagir entre si, e com a MEC. Além da necessidade da célula endotelial proliferar, associar-se e formar estruturas tubulares, um processo que envolve migração e adesão célula-célula e célula-matriz, ela também deve atrair pericitos ao redor do tubo endotelial e formar uma membrana basal. Uma organização vascular correta requer interações dessa unidade vascular básica (endotélio-pericitos-membrana basal) com as células ao redor (Gerhardt e Betsholtz, 2003; Hynes, 2007; Hielscher e Gerecht, 2012).

A angiogênese é regulada por um equilíbrio dinâmico entre fatores pró- e anti angiogênicos (Figura 5). Quando esse equilíbrio é quebrado, como no câncer, a balança tende para o lado pró-angiogênico, dando início ao processo de angiogênese, cuja primeira etapa é caracterizada pela dilatação e permeabilidade de vasos pré-existentes, induzidas pelo fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), bastante aumentado durante o desenvolvimento tumoral (Karamysheva, 2008; Allen e Louise, 2011). Posteriormente, há a degradação da lâmina basal, migração e proliferação das células endoteliais, que se organizam em forma de tubo, formando o lúmen vascular, adquirindo a forma de cordões sólidos. Finalmente, as células endoteliais secretam fatores de crescimento que atrairão células de suporte (pericitos), dando estabilidade ao vaso recém-formado e facilitando a chegada de células do músculo liso (Figura 6) (Gerhardt e Betsholtz, 2003; Hynes, 2007, Hielscher e Gerecht, 2012).

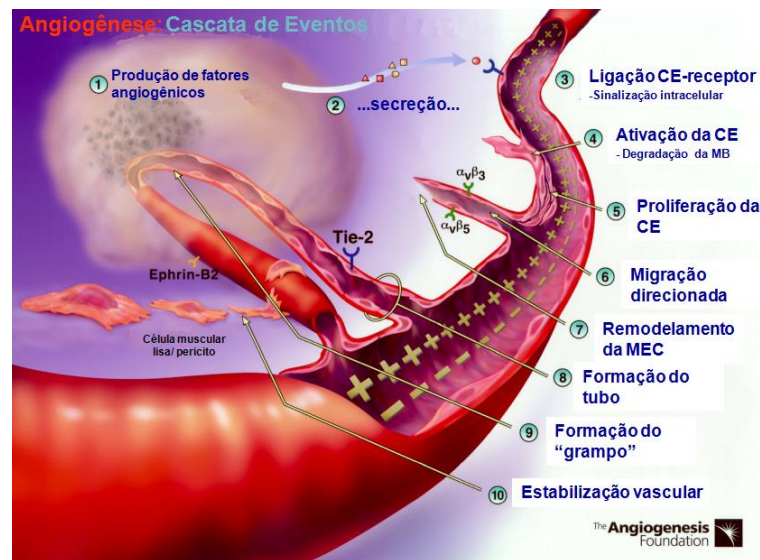
Figura 5 – Fatores angiostáticos e angiogênicos



Legenda: O desequilíbrio entre fatores pró- e anti angiogênicos.

Fonte: Adaptado de Yue e col., 2007.

Figura 6 – O processo angiogênico

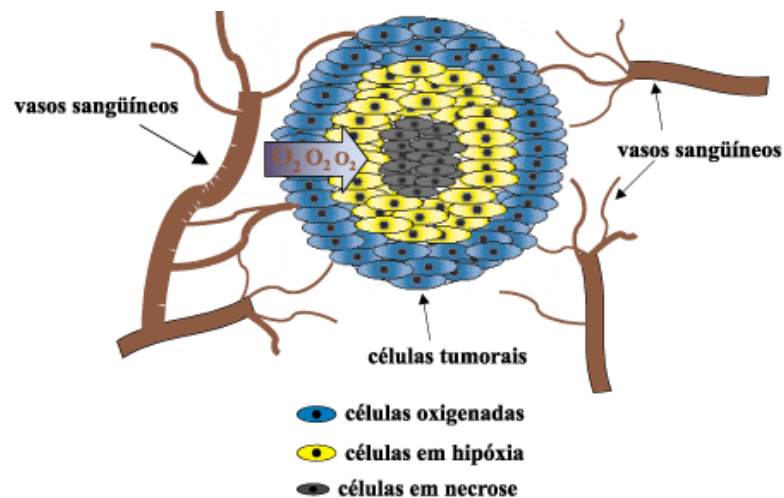


Legenda: O processo da angiogênese ocorre de acordo com os seguintes eventos: (1) Tumores produzem e (2) secretam fatores angiogênicos. (3) Os fatores angiogênicos se ligam a receptores específicos nas células endoteliais de vasos vizinhos. (4) As células endoteliais ativadas disparam sinalizações intracelulares e auxiliam na produção de fatores e enzimas, que degradam a membrana basal que envolve os vasos. (5) As células endoteliais começam a proliferar e migrar através da membrana basal, em direção ao tumor. (6) Integrinas ($\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$) direcionam o crescimento dos novos brotos. (7) Metaloproteases são produzidas para degradar a membrana basal, facilitando o crescimento dos novos vasos. (8) As células endoteliais se organizam em forma de tubo. (9) Conexão com outros vasos. (10) Os novos vasos se estabilizam com a chegada de células musculares lisas e pericitos.

Fonte: Adaptado de <http://www.angio.org/understanding/process.php>.

A formação de novos vasos é importante quando o tumor alcança um determinado tamanho (de 1 a 2 mm³), para suprir a carência de nutrientes e a formação de áreas privadas de oxigênio (hipóxia), principalmente nas camadas mais profundas da massa tumoral, que podem chegar a ficar em anóxia (Figura 7). Por esse motivo, as células tumorais se tornam incapazes de crescer sem o suporte vascular (Kurschat e Mauch, 2000; Emmett e col., 2011).

Figura 7 – Hipóxia e a indução da angiogênese



Legenda: Secção transversal de um tumor sólido, mostrando a diminuição da concentração de oxigênio em relação à distância capilar.

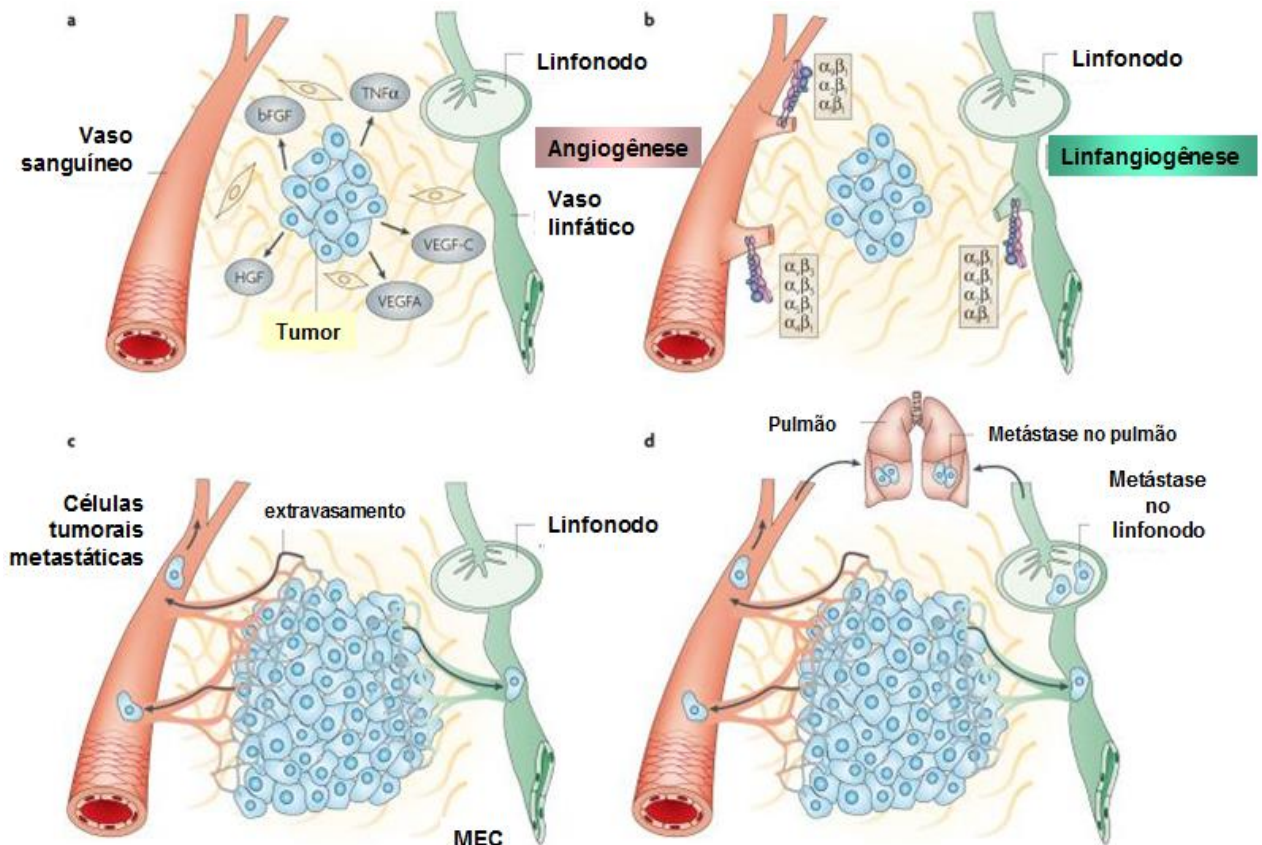
Fonte: Adaptado de Kennedy e col., 1980.

O ambiente hipóxico estimula a produção do fator de transcrição nuclear, HIF-1 α (fator induzido por hipóxia), pelas células tumorais. Em situações de carência de oxigênio, o HIF-1 α se liga em regiões responsivas no DNA, transcrevendo genes de proteínas e fatores pró-angiogênicos, incluindo o VEGF, angiopoetina-2, fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e reduzindo a expressão de fatores anti angiogênicos, como trombospondina (Kurschat e Mauch, 2000; Nizet e Johnson, 2009; Allen e Louise, 2011).

Dessa forma, as próprias células tumorais são capazes de induzir a angiogênese, por formarem um microambiente rico em fatores de crescimento e mitógenos que aumentam a expressão de integrinas na superfície das células endoteliais, permitindo a formação de novos vasos, em direção ao tumor (Figura 8) (Pilorget e col., 2007; Allen e Louise, 2011). A grande rapidez na formação de novos vasos induzida pelas células tumorais, faz com que as células endoteliais se organizem de maneira imprópria, criando vasos imaturos, tortuosos e permeáveis, diferente da vasculatura de um tecido normal (Brown e col., 2008; Jain, 2013).

Esses novos e frágeis vasos fornecem uma rota para células tumorais deixarem o tumor primário e entrarem na circulação sanguínea e linfática, facilitando a metástase (Figura 7) (Karamysheva, 2008; Mierk, 2012).

Figura 8 – Mecanismos reguladores da angiogênese e linfogênese



Legenda: (A) Células tumorais perto de vasos sanguíneos pré-existentes secretam fatores de crescimento e quimiocinas como VEGF, bFGF e TNF- α que estimulam o endotélio vascular quiescente a iniciar seu ciclo celular. Tumores também secretam fatores como VEGF-C, VEGF-A ou HGF que estimulam o crescimento de novos vasos linfáticos. (B) Esses fatores de crescimento aumentam a expressão de integrinas como $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$ em vasos sanguíneos e $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 1\beta 1$ em vasos linfáticos. (C) Essas integrinas promovem a migração e sobrevivência de células endoteliais durante a invasão do tecido tumoral, resultando na criação de novos vasos que vão aumentar o aporte de oxigênio e nutrientes para esse tumor. (D) Esses novos vasos capilares e linfáticos contribuem para a metástase.

Fonte: Adaptado de Avraamides e col., 2008.

Apesar dos fatores de crescimento estimularem o aparecimento de novos vasos, a interação da célula endotelial com a MEC também regula a sobrevivência, proliferação e motilidade das células durante a angiogênese. As interações estabelecidas entre as células e a MEC são, principalmente, mediadas por integrinas (Pilorget e col., 2007).

Por esses motivos, há um crescente número de estudos que visam à descoberta de novas terapias anti angiogênicas para conter o crescimento tumoral. Folkman (1971) deu início a pesquisas referentes à angiogênese em laboratório. Em 2004, a FDA (US Food and Drug Administration) aprovou o uso do medicamento Bevacizumab, que tem efeito anti angiogênico, para o tratamento de alguns tipos de câncer, dentre eles o melanoma, e passou a considerar a “quarta modalidade” do tratamento contra o câncer, depois da cirurgia, quimioterapia e radioterapia (Emmett e col., 2011).

1.3.2 VEGF e o seu receptor

O VEGF é uma sub-família de fatores de crescimento que possui seis membros conhecidos, em mamíferos: PlGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o VEGF-E (Ferrara, 2004; Samples e col., 2013). O VEGF foi descrito pela primeira vez como fator de permeabilidade vascular, secretado pelas células tumorais, que estimula um aumento rápido e reversível da permeabilidade microvascular sem dano para as células endoteliais (Senger e col., 1986).

As ações do VEGF são mediadas pelos receptores do tipo tirosina-quinase: VEGFR-1 (FLT-1 – *fms-like tyrosine kinase-1*), VEGFR-2 (FLK-1 ou KDR- *kinase insert domain-containing receptor*) e o VEGFR-3 (FLT-4) (Neufeld e col., 1999; Samples e col., 2013). Uma vez ativados pelo VEGF, esses receptores dimerizam e ativam diferentes cascatas de sinalização como a da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), quinase regulada por estímulo extracelular (ERK), quinase de adesão focal (FAK), fosfoinositol 3-fosfato quinase (PI3K) e proteínas anti apoptóticas, promovendo a sobrevivência e proliferação das células endoteliais (Ferrara e col., 2003, Karamysheva, 2008).

Durante a tumorigênese, as células tumorais secretam metaloproteases de matriz (MMP) para o remodelamento da MEC. A ação das MMP sobre a MEC libera o VEGF-A que está ancorado à mesma, e que está relacionado com o aumento da angiogênese (Lee e col., 2005, Mettouchi, 2012). A principal metaloprotease envolvida na liberação de VEGF é a

MMP-9 (Bergers e col., 2000; Vempati e col., 2013). O principal tipo de VEGF associado à MEC é uma isoforma de VEGF-A, obtida a partir de splicing alternativo, a qual apresenta dois domínios que conferem à molécula a habilidade de se associar com heparan sulfato e proteoglicanas presentes na MEC (Park e col., 1993, Vempati e col., 2013).

Outro papel da MEC sobre o VEGF, que é bastante discutido, é a participação de proteínas matricelulares como reguladoras da expressão do VEGF-A, como por exemplo, a trombospondina-1 (TSP-1) que foi capaz de inibir a expressão de VEGF em células endoteliais, tendo, portanto, atividade antiangiogênica (Greenaway e col., 2007; Trap e col., 2010; Campbell e col., 2010).

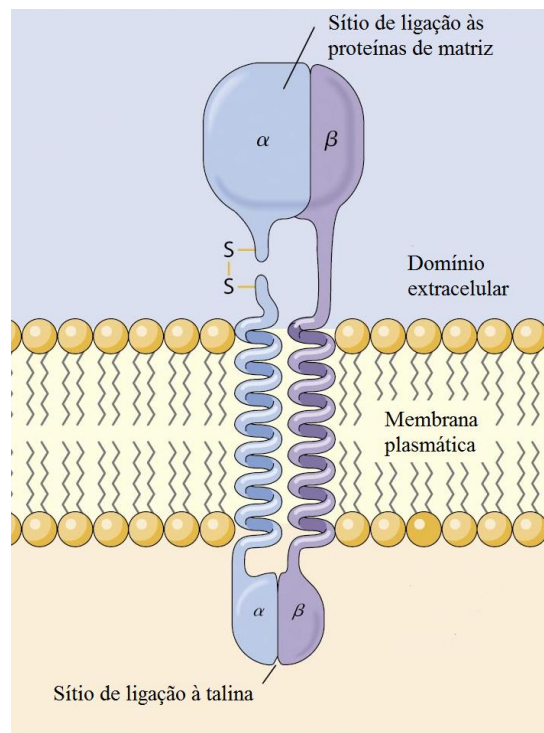
O VEGF-A é o principal mediador da angiogênese e tem sua expressão aumentada em tumores sólidos (Dvorak, 2002). Esse efeito pró-angiogênico é mediado, principalmente, pela ligação ao VEGFR-2, cuja ativação resulta no aumento da permeabilidade vascular e na migração e proliferação das células endoteliais que se organizam em tubos para a formação dos novos vasos (Ferrara, 2001). Entretanto, o VEGF-A também pode se ligar, com maior afinidade, ao VEGFR-1, que é encontrado em células endoteliais ou na forma solúvel (Karamysheva, 2008). Contudo, essa ligação com o receptor VEGFR-1 leva a uma fraca fosforilação (Seetharam e col., 1995). Acredita-se que esse receptor tenha função moduladora, para que não haja uma proliferação excessiva de células endoteliais induzida pela ativação do VEGFR-2 (Hiratsuka e col., 1998). Já a forma solúvel do VEGFR-1 sequestra o VEGF-A, impedindo, também, a sua ligação ao VEGFR-2 (Karamisheva, 2008).

Por esses motivos, o VEGF tem se tornado um alvo bastante estudado em pesquisas que visam à descoberta de terapias anti angiogênicas, impedindo o desenvolvimento tumoral. Terapias que tenham como alvo a via do VEGF, além de impedirem o aporte de oxigênio e nutrientes para a massa tumoral, também estarão contribuindo para a diminuição da metástase e até aumentando a sensibilidade do tumor às terapias convencionais (Harmey e Bouchier-Hayes, 2002; Emmett e col., 2011). Um dos principais medicamentos, já utilizados no tratamento contra o câncer, é o Bevacizumab, um anticorpo humano monoclonal anti-IgG contra o VEGF (Willet e col., 2004; Mahabeleshwar e Byzova, 2007; Emmett e col., 2011). No caso do melanoma, essas terapias anti angiogênicas, que têm como alvo o VEGF, são muito promissoras, haja vista que estudos recentes indicaram uma expressão basal de VEGF pelos melanócitos transformados, que é mais eficiente do que o VEGF produzido por hipóxia na indução da angiogênese no melanoma (Gille, 2006).

1.4 Integrinas e sinalização intracelular

As integrinas são proteínas transmembranas heterodiméricas formadas por uma subunidade α e uma subunidade β , associadas não covalentemente entre si (Figura 9). As subunidades α possuem em seus domínios citoplasmáticos sequências de aminoácidos altamente conservadas que estão relacionados a mecanismos de transdução de sinal (Hynes, 2002). Existem 18 tipos de subunidades α e oito tipos de subunidade β , que podem se combinar e formar 24 heterodímeros já descritos (Baker e Hagg, 2007, Marelli e col., 2013). A associação de diferentes subunidades α e β pode formar receptores com distintas especificidades de ligação às proteínas da MEC e, conseqüentemente, com diversas atividades biológicas (Baker e Hagg, 2007). A relação entre algumas integrinas e seus respectivos ligantes na MEC está ilustrada na tabela 3.

Figura 9 - Representação esquemática da estrutura das integrinas



Legenda: As integrinas são constituídas por uma subunidade α e uma subunidade β . Cada subunidade possui um grande domínio extracelular responsável por reconhecer proteínas de matriz, uma região transmembrana e um pequeno domínio citoplasmático que interage com moléculas acessórias, ativando diversas vias de sinalização.

Fonte: www.myvisiontest.com/img/integrin.jpg

Tabela 3. Classificação de integrinas de acordo com a subunidade β

INTEGRINA	LIGANTE
Integrinas β_1	
$\alpha_1\beta_1$ (VLA-1)	Colágeno I, Colágeno IV, Laminina
$\alpha_2\beta_1$ (VLA-2)	Colágeno I, Laminina
$\alpha_3\beta_1$ (VLA-3)	Laminina, Entactina, Fibronectina
$\alpha_4\beta_1$ (VLA-4)	Fibronectina, VCAM-1
$\alpha_5\beta_1$ (VLA-5)	Fibronectina
$\alpha_6\beta_1$ (VLA-6)	Laminina
$\alpha_7\beta_1$ (VLA-7)	Laminina
$\alpha_8\beta_1$ (VLA-8)	Fibronectina
$\alpha_9\beta_1$ (VLA-9)	VCAM-1, Tenascina, Osteopontina
$\alpha_{10}\beta_1$	Colágeno
$\alpha_{11}\beta_1$	Colágeno
$\alpha_v\beta_1$	Fibronectina, Vitronectina
Integrinas β_2	
$\alpha_D\beta_2$	VCAM-1, ICAMs
$\alpha_L\beta_2$ (LFA-1)	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
$\alpha_M\beta_2$ (Mac-1)	ICAM-1, Fator X, C3bi, Fibrinogênio
$\alpha_X\beta_2$ (gp150/95)	C3bi, Fibrinogênio
Integrinas β_3	
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibrinogênio, Fibronectina, Fator de von Willebrand, Vitronectina
$\alpha_v\beta_3$	Entactina, Vitronectina
Integrinas β_4	
$\alpha_6\beta_4$	Laminina
Integrinas β_5	
$\alpha_v\beta_5$	Vitronectina
Integrinas β_6	
$\alpha_v\beta_6$	Tenascina, Vitronectina
Integrinas β_7	
$\alpha_4\beta_7$	Fibronectina, MadCAM, VCAM
$\alpha_E\beta_7$	E-caderina
Integrinas β_8	
$\alpha_v\beta_8$	Colágeno, Fibronectina, Laminina

Fonte: Adaptada de www.integrins.hipermat.net

O termo integrina ressalta o papel destes receptores na integração do citoesqueleto celular com a MEC (Hynes, 2002). Estas interações levam à reorientação do citoesqueleto de actina, modificando o comportamento e morfologia celulares, sendo essencial em processos biológicos como adesão, migração, proliferação e sobrevivência celular (Giancotti e Ruoslatti, 1999; Bolós e col., 2010; Guan, 2010). Essa interação com a MEC é tão importante para a célula que a perda da adesão celular, mediada pela integrina, ocasiona um tipo específico de apoptose, conhecida como ANOIKS (Frisch e Francis e col., 1994; Marastoni e col., 2008).

As proteínas de matriz extracelular, embora estruturalmente diferentes, requerem sequências de reconhecimento semelhantes para se ligarem às integrinas. Estas proteínas possuem em comum uma sequência RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), também conhecida como sítio universal de reconhecimento. O tripeptídeo RGD está presente em alguns componentes da matriz como fibronectina, vitronectina, laminina e colágeno (Giancotti e Tarone, 2003; Marelli e col., 2013).

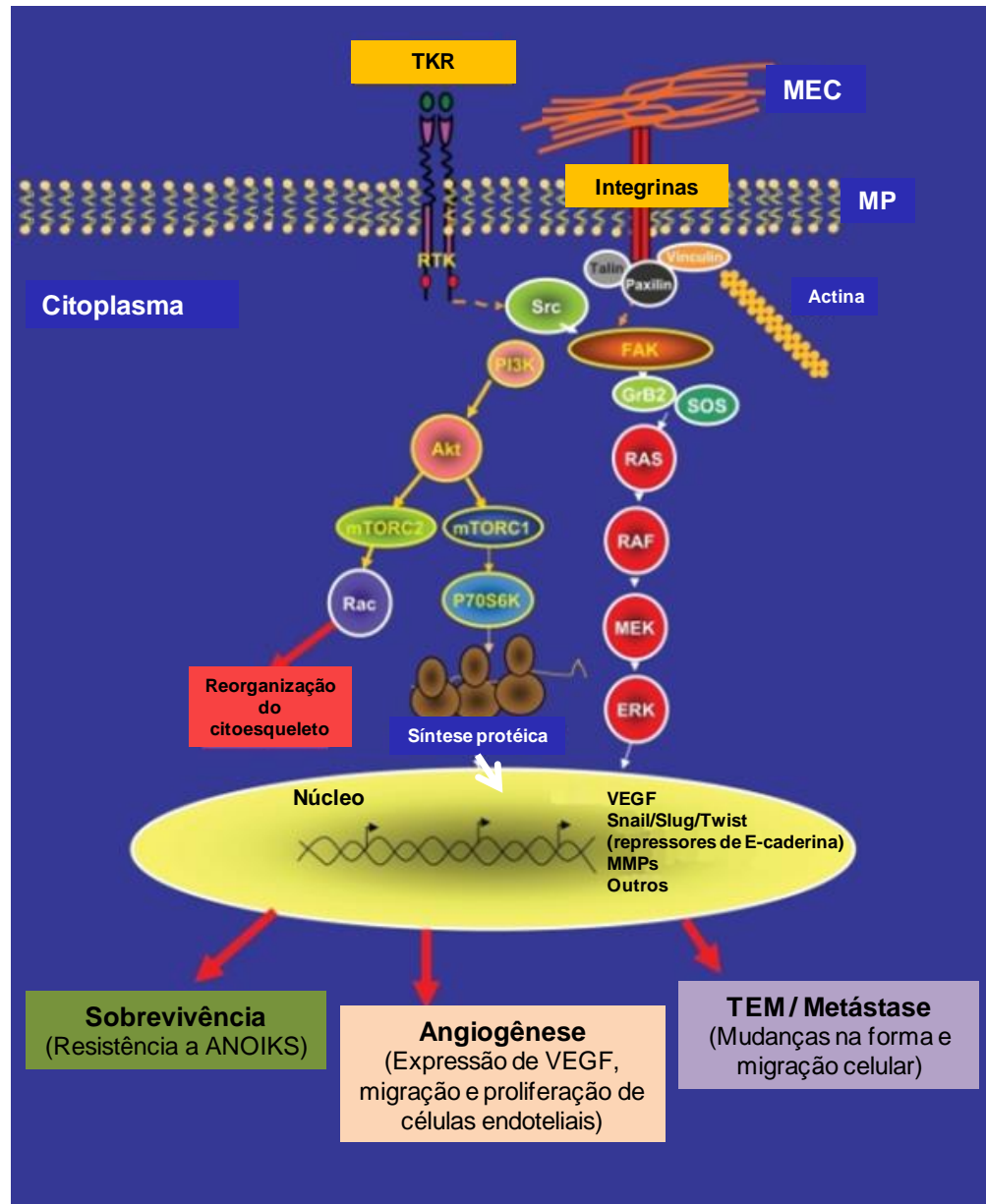
Além de serem importantes componentes estruturais e de participarem da arquitetura tecidual, as integrinas desempenham um papel central na sinalização celular para diversos processos biológicos. A ativação e a subsequente sinalização disparada pelas integrinas são propagadas desde a porção extracelular da proteína até o domínio citoplasmático e vice-versa. Desta forma, as integrinas são capazes de transmitir as informações entre os meios externo e interno (Liddington e Ginsberg, 2002; Yue e col., 2012).

As integrinas estão presentes na superfície celular na conformação inativa, onde a sua região N-terminal do domínio extracelular encontra-se voltada para a membrana (Xiong e col., 2002). Ao serem ativadas, as integrinas mudam sua conformação de modo a permitir a interação com uma série de moléculas sinalizadoras (Liu e col., 2000; Guan, 2010).

Quando as integrinas se ligam às proteínas da MEC, ocorre a ativação e o agrupamento de integrinas na base da membrana celular (*clustering* de integrinas), formando um complexo sinalizador que promove a reorganização dos filamentos de actina. Essa organização reforça a ligação com a MEC e forma os pontos de adesões focais (Hynes, 2002; Bolós e col., 2010). Posteriormente, há a ativação de FAK, que se autofosforila e passa a servir de plataforma para o recrutamento de proteínas acessórias, como talina e paxilina, além de iniciar a ativação das RhoGTPases, que levam a mudanças na organização do citoesqueleto de actina, da PI3K, da MAPK, da Src e de fosfatases e fatores de transcrição, podendo

também afetar a transcrição gênica (Giancotti e Ruoslatti,1999; Oliva e col, 2007; Guan, 2010; Bolós e col., 2010; Xiong e col., 2013) (Figura 10).

Figura 10 - Sinalização mediada por integrinas



Legenda: A ativação de integrinas induz o recrutamento de moléculas acessórias que fosforilam proteínas sinalizadoras envolvidas em importantes processos celulares (sinalização “de fora para dentro”). Fatores de crescimento podem levar a ativação de integrinas e aumentar a afinidade destas proteínas pelos componentes de matriz, induzindo vias de sinalização mencionadas anteriormente (sinalização “de dentro para fora”).

Fonte: Bolós e col., 2010, f. 85.

Quando ativada, a PI3K induz a liberação de mediadores lipídicos, como o fosfoinositol trisfosfato (PIP₃), que atuam como segundos mensageiros, ativando a AKT. Esta proteína, por sua vez, está envolvida tanto no controle da apoptose como também na ativação de pequenas GTPases como a Rac que induzem a mobilização do citoesqueleto de actina, levando à migração celular (Cantley, 2002; Liu e col., 2009). Além disso, essa via está frequentemente alterada durante a progressão tumoral, contribuindo para o crescimento, invasão e metástase tumoral (Martini e col., 2013).

A autofosforilação de FAK no resíduo de tirosina 397 (Tyr³⁹⁷) induz a ativação de vias de sinalização intracelulares envolvidas em importantes processos biológicos como sobrevivência, adesão, migração, divisão celular e expressão gênica (Giancotti e Ruoslatti, 1999; Hunttenlocher e Horwitz, 2011). A FAK tem sua expressão frequentemente aumentada em vários tipos de câncer, induzindo angiogênese, por ativar células endoteliais, além de aumentar a proliferação tumoral, por degradar a proteína supressora de tumor (p53) (Ilic e col., 1995; Lim e col., 2008; Bolós e col., 2010). Além disso, a ativação de FAK pode gerar um sítio de alta afinidade para a ligação de membros da família Src de tirosinas quinases. A formação do complexo FAK-Src pode levar a fosforilação de outros resíduos de tirosina da FAK, como Tyr⁵⁷⁶ e Tyr⁵⁷⁷, potencializando a sua ativação (Hynes, 2002; Brunton e col., 2005; Bolós e col., 2010) e gerando novos sítios de ligação para outras moléculas de sinalização, podendo, dessa forma, amplificar a sinalização intracelular. Estudos mostram que a associação de FAK com Src promove a invasão, migração e angiogênese em processos tumorais (Ferguson e col., 2013).

Vários estudos têm investigado os mecanismos moleculares envolvidos na transativação entre as integrinas e receptores com atividade tirosina quinase (*tyrosine kinase receptor*, TKR), como o VEGFR ou GPCRs (Eliceri, 2001; Somanath e col., 2009; Koch e col., 2011). Nesse processo, a adesão da célula à MEC, via integrina, induz a fosforilação de resíduos específicos do VEGFR, amplificando os efeitos do VEGF, que garantem o crescimento, sobrevivência e diferenciação das células endoteliais, em processos fisiológicos e patológicos (Somanath e col., 2009; Galvagni e col., 2010). Vários estudos vêm mostrando que a fosforilação do VEGFR2 está aumentada nas células endoteliais cultivadas sobre vitronectina, um ligante clássico da integrina $\alpha\beta_3$, e que esses efeitos podem ser inibidos com o uso de anticorpos bloqueadores de integrinas (Soldi e col., 1999; Borges e col., 2000; Somanath e col., 2009; Papo e col., 2011). Montenegro e colaboradores (2012) demonstraram que o bloqueio da integrina $\alpha\beta_3$ por uma desintegrina (DisBa-01) impedia a sinalização de

VEGF nas células endoteliais, sugerindo uma possível regulação entre esses dois receptores. Alguns estudos sugerem o envolvimento de c-Src regulando a associação entre integrinas e o VEGFR2, levando à angiogênese (Eliceri, 2001; Basson, 2008; Somanath e col., 2009; Galvagni e col., 2010).

Transformações malignas e o desenvolvimento do processo metastático estão intimamente ligados às alterações na expressão de integrinas assim como na sinalização intracelular mediada por esses receptores (Kuphal e col., 2005). A interação entre células tumorais e a matriz extracelular, mediada por integrinas, influencia a proliferação, migração e metástase tumoral (Brakebush e col., 2002; Mierke e col., 2011). Além disso, diversos estudos fortalecem as hipóteses sobre a importância da expressão de integrinas no contexto da angiogênese tumoral. Pilorget e colaboradores (2007) mostraram que a interação entre a lectina Lelectina e integrinas das células endoteliais poderia inibir processos angiogênicos no câncer cerebral e, ainda, Li e colaboradores (2012) mostraram que certas integrinas apresentam um importante papel na promoção da angiogênese cerebral em resposta à hipóxia. Outros trabalhos mostram que durante a transformação maligna há mudanças no perfil de ativação de integrinas (Marshall e col., 1998; Xiong e col., 2013). A integrina $\alpha v \beta 3$, por exemplo, é bem expressa em diversos tumores, e está envolvida com o aumento da invasão de células tumorais e da proliferação de células endoteliais durante a angiogênese (Trikha e col., 1994; Nasulewicz-Goldeman e col., 2012; Samples e col., 2013).

Portanto, as integrinas desempenham um papel importante não só na resposta imune-inflamatória, como também na embriogênese, angiogênese e no desenvolvimento de metástases (Yonekawa e Harlan, 2005). Por esta razão, são consideradas alvos em potencial no desenvolvimento de terapias anti-cancer. Dessa forma, é de vital importância a identificação de moléculas ligantes de integrinas, para serem utilizadas, futuramente, como ferramentas de estudos acerca dos mecanismos moleculares e celulares desencadeados a partir dessas interações (Barja-Fidalgo e col., 2005).

1.5 Desintegrinas

Os estudos das interações das integrinas com os seus ligantes tiveram um salto significativo com a descoberta de peptídeos extraídos de veneno de serpente, denominados desintegrinas, com potente atividade antagonista da agregação plaquetária e das funções

adesivas das integrinas (Huang e col., 1987). Desintegrinas são peptídeos de baixo peso molecular, formados por domínios ricos em cisteína. Possuem uma sequência de tripeptídeos (RGD- arginina, glicina e ácido aspártico), que é reconhecida por integrinas presentes na superfície celular. Outras sequências tripeptídicas também são encontradas em algumas desintegrinas e tem capacidade de se ligar às integrinas, como KGD, MVD, MLD, VGD, ECD ou MDG (Calvete e col., 2008).

Essa sequência tripeptídica confere às desintegrinas a capacidade de se ligar seletivamente às integrinas, interferindo com suas funções (McLane e col., 1998; Marcinkiewicz, 2005). A diversidade de aminoácidos adjacentes à sequência RGD e as diferentes posições das ligações bissulfeto determinam a especificidade a diferentes integrinas (Barja-Fidalgo e col., 2005; Selistre-de-Araujo e col., 2010). Além disso, diversos estudos têm demonstrado o efeito de desintegrinas na inibição do desenvolvimento e metástase tumoral (Tripathi e col., 1994; Pilorget e col., 2007; Oliva e col., 2007; Selistre-de-Araujo e col., 2010; Calvete, 2013).

1.5.1 ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase)

As ADAM são proteínas transmembrana membros da família das proteases dependentes de zinco, assim como são as metaloproteases de matriz e as metaloproteases de veneno de serpentes (SVMP) (Selistre-de-Araujo e col., 2010). As proteínas ADAM são constituídas por uma sequência sinal, um pró-domínio, um domínio metaloprotease, um domínio tipo-desintegrina ou ligante de integrina contendo uma região rica em cisteína, além do domínio EGF, um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática rica em prolina. O domínio desintegrina das proteínas ADAM é constituído principalmente pelo tripeptídeo ácido glutâmico-cisteína-ácido aspártico (ECD) (Calvete e col., 2005).

Pelo fato de apresentarem ambos os domínios metaloprotease e desintegrina, as proteínas ADAM podem atuar tanto como enzimas proteolíticas, quanto ligantes de integrinas. Dessa forma, são capazes de clivar moléculas de matriz extracelular, bem como moléculas ancoradas às membranas celulares, como citocinas ou fatores de crescimento, e sua atividade é fortemente inibida por quelantes de íons zinco (Black e White, 1998).

Em algumas proteínas ADAM, a sequência catalítica clássica no domínio metaloprotease está ausente, portanto participam de fenômenos celulares como a adesão

célula-célula ou célula-matriz, e ativação de vias de sinalização através do domínio desintegrina (Yang e col., 2006). Análises estruturais mostram que este domínio possui homologia com a seqüência de peptídeos de uma classe de desintegrinas (SVMP), as quais já foram caracterizadas como ligantes de integrinas (Primakoff e Myles, 2000).

Diversas patologias estão associadas à disfunção de proteínas ADAM, dentre elas o câncer. Muitos trabalhos investigam a contribuição da ADAM9 no desenvolvimento de diferentes tipos de câncer (Peduto, 2009; Zigrino e col., 2011), como o de mama (Weskamp e col., 1996), de próstata (Fritzsche e col., 2008), de fígado (Mazzoca e col., 2005), de pulmão (Shintani e col., 2004), de pâncreas (Yamada e col., 2007) e gástrico (Carl-McGrath e col., 2005), destacando a relevância da ADAM9 para a biologia de tumores.

Uma função desempenhada pela ADAM9 no desenvolvimento de tumores está associada ao domínio desintegrina. Esta proteína possui uma seqüência ECD no domínio desintegrina, permitindo que seja reconhecida pelas integrinas, como $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$ (Selistre-de-Araujo e col., 2010). Estudos mostraram que o tratamento de células de tumor de mama com o domínio desintegrina da ADAM9 (ADAM9D) foi capaz de inibir a migração dessas células sobre o matrigel, contribuindo para a redução da massa tumoral (Cominetti e col., 2009).

1.5.2 DisBa-01

A DisBa-01 é uma desintegrina isolada do veneno da serpente *Bothrops alternatus* através de técnicas de recombinação gênica (Ramos e col., 2007). Essa desintegrina tem 11,637 kDa e é uma metaloprotease de veneno de serpente (SVMP). Portanto, possui um domínio de ligação à integrina, com seqüência RGD, e um domínio metaloprotease (Ramos e col., 2007). Kauskot e colaboradores (2008) mostraram que a essa desintegrina tem alta afinidade pelas integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha I Ib\beta 3$.

A DisBa-01 foi descrita como um potente inibidor da integrina $\alpha v\beta 3$, inibindo a angiogênese e metástase. Nesse trabalho, DisBa-01 inibiu a adesão e proliferação de células endoteliais, que expressam $\alpha v\beta 3$, sobre vitronectina, e ainda diminuiu a angiogênese em modelos *in vivo* em plug de matrigel (Ramos e col., 2007). Estudos recentes mostraram que essa desintegrina inibe a migração de células tumorais (Selistre-de-Araujo e col., 2010) e a adesão de fibroblastos e células de tumor de mama ao colágeno tipo I em condições de fluxo

(onde o fluxo sanguíneo é mimetizado) e ainda diminui a expressão de mRNA de VEGF e do seu receptor, contribuindo para a diminuição da angiogênese (Montenegro e col., 2012).

1.5.3 Eristostatina

Morris e colaboradores (1995) e Beviglia e colaboradores (1995) foram os primeiros a testar os efeitos da Eristostatina, uma desintegrina purificada do veneno da serpente *Eristocophis macmahoni* que possui uma sequência RGD com oito cisteínas adjacentes. Esses autores observaram que a Eristostatina diminuiu o aparecimento de focos metastáticos das células de melanoma B16F10 no pulmão e no fígado de camundongos C57BL/6. Além disso, viram que essa desintegrina inibe a adesão das células de melanoma murino sobre laminina, fibronectina e vitronectina. Estudos posteriores mostraram que essa desintegrina não altera a angiogênese, mas diminui a motilidade da célula de melanoma. Esse efeito foi mediado por integrinas em contato com fibronectina (Tian e col., 2007). A Eristostatina se liga preferencialmente a $\alpha 4\beta 1$ (Danen e col., 1998) e $\alpha IIb\beta 3$ (McLane e col., 1996). Apesar disso, o mecanismo pelo qual essa desintegrina modifica as funções das células de melanoma humano e murino ainda é desconhecido.

1.6 Matriz extracelular

A matriz extracelular, também chamada de membrana basal, ou lâmina basal, é uma camada contínua de 50 a 200 nm de espessura, constituída de um conjunto de proteínas, glicoproteínas, polissacarídeos e proteoglicanas, que se organizam em redes. A MEC está presente além da vizinhança imediata da membrana plasmática, circundando diversas células e alinhando-se abaixo do revestimento epitelial interno de vasos sanguíneos (Alberts, 2010). As membranas basais fornecem suporte mecânico às células aderidas; servem como substrato para a migração e desenvolvimento celular; separam tecidos adjacentes no interior de um órgão e atuam como uma barreira à passagem de macromoléculas (Joshi e col., 1993; Lu e col., 2012).

As interações entre a célula e a MEC, bem como com as células adjacentes, auxilia a percepção da sua localização tridimensional, auxiliando na sua orientação e polaridade,

contribuindo para a homeostase tecidual e funcionamento dos órgãos (Cox e Erler, 2011; Lu e col., 2012). A perda da interação célula-matriz leva a ANOIKS (Marastoni e col., 2008).

Por muito tempo a MEC foi vista apenas como uma estrutura inerte, importante para manter a morfologia tecidual. Atualmente, sabe-se que a MEC também tem um papel regulatório chave na determinação da forma e das atividades da célula (Marastoni e col., 2008; Soucy e Romer, 2009; Alves e col., 2011). Seus componentes modulam, por exemplo, o crescimento, diferenciação, proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais, durante a angiogênese. Assim, favorecem a neovascularização necessária para a nutrição e aporte de oxigênio para o crescimento tumoral (Davis e Senger, 2005; Pilorget e col., 2007).

Dependendo da origem do tecido e do contexto, como em processos inflamatórios e durante o crescimento tumoral, a arquitetura tridimensional da matriz pode sofrer um remodelamento estrutural e bioquímico. Durante a progressão tumoral há uma forte deposição e proteólise de matriz extracelular, modificando as propriedades biomecânicas da MEC (Peranzoni e col., 2013; Van Dijk e col., 2013).

As células respondem às mudanças da MEC principalmente através de integrinas. Essa interação é possível graças à sequência RGD, que está presente em diferentes proteínas de matriz e é reconhecida pelas integrinas, possibilitando a sua ligação (Takagi e Springer, 2002; Campbell e col., 2010). A MEC pode influenciar a morfogênese capilar, provocando mudanças na forma da célula e na organização do citoesqueleto de actina das células endoteliais (Davis e Senger, 2005; Regatieri e col., 2009). Além disso, crescentes evidências mostram que a interação entre células tumorais com diferentes proteínas de matriz tumoral influencia a mudança para um estado metastático, fazendo com que a MEC tenha um papel ativo na transformação neoplásica (Marastoni e col., 2008; Barkan e col., 2010). Estudos recentes ressaltam a importância da MEC como um componente chave do microambiente tumoral por estar em contato imediato com células tumorais e endoteliais, durante a progressão tumoral (Barkan e col., 2010). Os eventos do microambiente são transformados em sinais que regulam o comportamento celular nos sítios de adesão célula-matriz, mediados por integrinas (Hynes e col., 2002; Soucy e Romer, 2009; Lu e col., 2012).

A diversidade de componentes da matriz extracelular e de mecanismos que controlam a síntese e degradação da MEC mostram a complexidade de mecanismos pelos quais a matriz pode controlar vários eventos relacionados à neovascularização (Davis e Senger, 2005). A maior expressão de colágeno I, por exemplo, pode estimular a formação de túbulos pelas células endoteliais. Já a presença de altos níveis de fibronectina na matriz influencia vias pró-

angiogênicas identificadas na patogenia do câncer de pulmão (Steele e col., 2011). O aumento da expressão de trombospondina-1 (TSP-1) contrabalança o efeito do VEGF nas células endoteliais, sendo um inibidor natural da angiogênese (Ferrari e col., 2002; Trapp e col., 2010). Nas células de melanoma, a TSP-1 aumenta o recrutamento de macrófagos em tumores transplantados de camundongos imunodeficientes e mantém os macrófagos com fenótipo antitumorigênico (M1). Além disso, a TSP-1 aumenta a ativação de TGF- β 1 que é necessário para a progressão normal da cicatrização (Llera e col., 2010). Além disso, a ação de proteases, como a ADAM e a plasmina, sobre as proteínas de MEC pode liberar fragmentos com atividades diferentes da proteína inteira. A TSP-1 quando clivada pode gerar um fragmento N-terminal (25 kDa) com características pró-angiogênicas, capaz de se ligar a heparina, heparan sulfato, α 3 β 1 e syndecan-4 (Chandrasekaran e col., 2000; Taraboletti e col., 2000; Ferrari do Outeiro-Bernstein e col., 2002). A tenascina-C (TN-C) pode induzir e intermediar a adesão celular, facilitando a migração e proliferação celular, estando envolvida no crescimento tumoral e na angiogênese. A TN-C tem sido estudada por induzir a perda da adesão focal em células endoteliais (Chung e col., 1996; Zagzag e col., 2002; Orend e Chiquet-Ehrismann, 2006). Porém, Saito e colaboradores (2008) mostraram um efeito anti-angiogênico da TN-C, inibindo a proliferação e migração de células endoteliais. Apesar da TN-C estar muito expressa em vários tumores, essa proteína de MEC foi primeiramente caracterizada como o principal produto secretado por células de glioma (Bourdon e col., 1983; Alves e col., 2011), estando correlacionada com a angiogênese e proliferação tumoral no glioblastoma, além de aumentar a malignidade do melanoma (Llera e col., 2010; Alves e col., 2011). A interação de células com a laminina promove adesão celular, angiogênese, afeta expressão gênica e está envolvida na proliferação, migração e diferenciação celular. A interação da laminina com a célula tumoral é importante para os eventos de invasão tumoral e metástase (Engbring e Kleinman, 2003). Além disso, a laminina foi vista como um agente quimiotático para células tumorais, e indutor de proteases, como a MMP-2, que degradam vários componentes da matriz extracelular, contribuindo para a invasão tumoral e metástase (Givant-Horwitz e col., 2005). Outro estudo mostra que a laminina, especialmente a laminina-332, também parece estar envolvida na regulação dos processos de adesão e migração dos melanócitos e melanoma (Chung e col., 2010).

Trabalhos também mostram a importância das proteínas de matriz extracelular na promoção da angiogênese (Davis e Senger, 2005; Mahabeleshwar e Byzova, 2008; Regatieri e col., 2009). Durante a progressão tumoral, células tumorais e células imunes recrutadas para o

microambiente tumoral são capazes de secretar MMP. Essas proteases clivam a matriz, facilitando a migração celular, e também remodelam a MEC tumoral, tornando-a rica em proteínas que facilitam o seu desenvolvimento (Li e col., 2012). A degradação da MEC pelas MMP pode induzir a angiogênese porque sua ação libera citocinas, metaloproteases e fatores de crescimento, como o VEGF, que são encontrados imobilizados e aprisionados na MEC (Davis e Senger, 2005). A gelatinase MMP-9 é altamente relacionada com o aumento da angiogênese, por digerir a membrana basal e liberar o VEGF ancorado na matriz extracelular (Bergers e col., 2000; Emmett e col., 2011).

Portanto, a elucidação dos sinais moleculares que modulam as interações entre as células vasculares, as células tumorais e a matriz extracelular são de extrema relevância para uma melhor definição de abordagens terapêuticas em terapias que visem à prevenção e/ou morte tumoral.

1.7 Microambiente tumoral

Até a segunda metade do século XX acreditava-se que os tumores eram “ilhas”, dando importância apenas para as células tumorais e suas alterações genéticas, levando à proliferação celular desordenada (Stratton e col., 2009). Hoje, sabe-se que o câncer é muito mais complexo, porque envolve a participação de diversas células que atuam em conjunto para o crescimento tumoral. Nesse contexto surgiu o termo “microambiente tumoral”, dando suporte a uma hipótese antiga, proposta por Paget em 1889: “Semente e solo”, do inglês “Seed and Soil”. (Kenny e col., 2007; Hanahan e Weinberg, 2011).

Vários estudos mostram que o desenvolvimento do câncer pode ser promovido ou exacerbado por processos inflamatórios e infecciosos (Lin e Karin, 2007). Dessa forma, o microambiente tumoral tornou-se um novo alvo terapêutico, juntamente com as terapias clássicas como radioterapia, quimioterapia e cirurgia (Postovit e col., 2006; Allen e Louise, 2011).

O microambiente tumoral é extremamente complexo, constituído por componentes da matriz extracelular tumoral, fatores de crescimento (como bFGF, VEGF, EGF, TGF- β), interleucinas, citocinas e concentrações variáveis de oxigênio (Okuyama e Inoue, 2011; Allen e Louise, 2011). Tais fatores perturbam a homeostase tecidual e o comportamento celular. Existe ainda a presença de uma grande população de células heterogêneas, como

fibroblastos, pericitos, células musculares lisas, células imunes e células endoteliais (Zhang e Liu, 2013). A participação de diversos tipos celulares neste microambiente é denominada desmoplasia (Mueller e Fusenig, 2004; Allen e Louise, 2011).

Coletivamente, os eventos de remodelamento da MEC, transição epitélio-mesenquimal, formação de novos vasos, e secreção de diversos fatores de crescimento por diversas células, conferem a arquitetura necessária para o desenvolvimento e metástase das células tumorais (Figura 11) (Postovit e col., 2006; Stuelten e col., 2010).

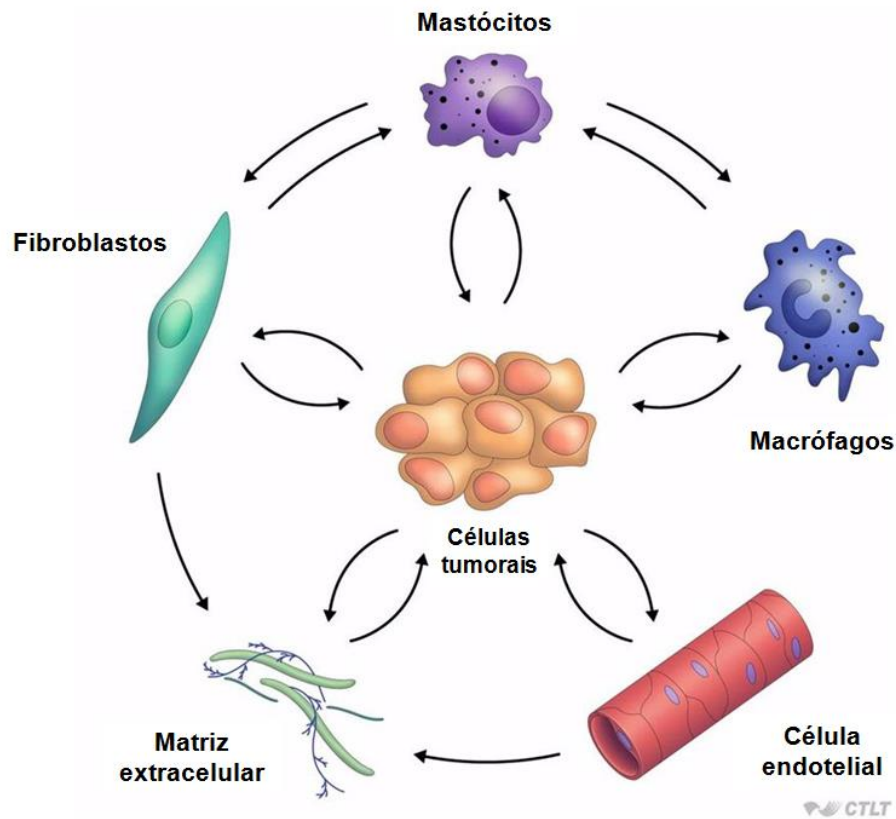
Diversos trabalhos mostraram que os fibroblastos associados ao câncer (CAFs) contribuem para o crescimento e disseminação tumoral, através da liberação de alguns fatores de crescimento, como EGF e TGF- β , assim como a liberação de quimiocinas e citocinas, como o fator derivado do estroma (SDF-1 α) e a proteínas quimioatraente de monócito (MCP-1) que recrutam células endoteliais e células imunes, respectivamente, para a massa tumoral, levando ao aumento da formação de vasos (Allen e Louise, 2011; Zhang e Liu, 2013).

Macrófagos, mastócitos, neutrófilos e linfócitos T e B são as principais células inflamatórias que compõem a massa tumoral (Egeblad e col., 2010). Os macrófagos associados ao tumor (TAMs) produzem fatores que promovem a tumorigênese, como VEGF e EGF, secreção de citocinas e enzimas que promovem a invasão, angiogênese e metástase, além de diminuírem a expressão de fatores anti angiogênicos, como a IL-12 (Allen e Louise, 2011; Spano e Zollo, 2012).

O microambiente tumoral também influencia no comportamento das células endoteliais, aumentando sua migração, favorecendo a formação de novos vasos sanguíneos que contribuem para o crescimento tumoral (Hendrix e col., 2003; Lin e Karin, 2007; Franses e col., 2011).

Concomitante com a expressão de fatores de crescimento, as células tumorais também secretam enzimas proteolíticas que remodelam a MEC, desestabilizando as adesões fortes entre as células tumorais e a matriz, o que favorece a proliferação e migração celular criando um ambiente pró-migratório e pró-invasivo (Lin e Karin, 2007).

Figura 11 – Microambiente tumoral



Legenda: Células tumorais interagem não apenas com componentes da matriz extracelular, mas igualmente com outros elementos celulares, como fibroblastos, células do sistema imune, células endoteliais e pericitos.

Fonte: Adaptado de

<http://ocw.jhsph.edu/index.cfm/go/imageLib:il.search.imageDetails/resourceID/577EC8D4-E11B-D1A8-D253C842F4E41F74/searchString/tumor%20microenvironment/>.

Porém, a contribuição da interação da matriz tumoral com a célula endotelial e as consequências dessa interação sobre a angiogênese associada ao tumor ainda precisam ser melhor estudadas. A maioria dos trabalhos que mostram a participação de proteínas de matriz extracelular utilizam uma matriz comercial bidimensional. Trabalhos recentes, como Soucy e colaboradores (2009) e Alves e colaboradores (2011), vêm utilizando uma matriz tridimensional derivada de células tumorais, como modelo para estudar eventos celulares relacionados à angiogênese tumoral. Essa matriz produzida pelas próprias células tumorais é tridimensional e mimetiza, mais eficientemente, o microambiente tumoral *in vivo*, diferenciando-a das matrizes comercialmente vendidas, que são bidimensionais.

A elucidação dos sinais moleculares que modulam as interações entre as células vasculares, as células tumorais e a matriz extracelular são de extrema relevância para uma melhor definição de abordagens terapêuticas em terapias que visem à prevenção e/ou morte tumoral.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho visa estudar como a matriz extracelular do melanoma modifica o comportamento das células endoteliais, através de interações célula-matriz, levando a angiogênese, além de avaliar a interferência das desintegrinas nessas interações.

2.2 Objetivos específicos

Dentro do objetivo geral proposto neste estudo, comparamos os efeitos das matrizes derivadas de melanoma e melanócitos humano, utilizando matrizes extracelulares produzidas por células de melanoma e por melanócitos humanos como substrato para adesão de células endoteliais humanas responsáveis pela angiogênese, observando:

- As características estruturais das matrizes produzidas por MV3 e NGM;
- A ativação de vias dependentes de integrinas (FAK, AKT e Src);
- As diferenças na organização do citoesqueleto de actina;
- A ativação de receptores de fatores de crescimento (transativação);
- As integrinas que podem estar envolvidas nesse modelo, com o uso de desintegrinas.

3 METODOLOGIA

3.1 Desintegrinas utilizadas

Tabela 4. Dados das desintegrinas utilizadas nos experimentos

Nome da desintegrina	Serpente em que é isolada	Principal integrina com a qual interage	Referência
ADAM9D*	-	$\alpha 6\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$	H. Selistre de Araujo
Kistrina	<i>Agkistrondon rhodostome</i>	$\alpha v\beta 3$	C. Marcinkievcz
ALTC e DisBa-01	<i>Bothrops alternatus</i>	$\alpha 1\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$	H. Selistre de Araujo
Eristostatina	<i>Eristicophis macmahoni</i>	$\alpha 4\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ e $\alpha II\beta 3$	C. Marcinkievcz
Flavoridina	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	$\alpha 5\beta 1$	Sigma Chemical Co.

* A ADAM9D foi clonada de uma linhagem de célula de melanoma humano VMM12 e purificada de *E.coli* AD494 (DE3)pADAM9D LPS free, como descrito (Cominetti e col., 2009).

3.2 Linhagens celulares

A linhagem celular de melanócito humano (NGM, N° 0190; tecido: epitélio; órgão: pele; tipo: melanócito; patologia: Nevo), obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro, RJ, Brasil; linhagem de melanoma humano (MV3), com alto potencial metastático (van Muijen e col., 1991), doada pelo Dr. Cezary Marcienkevickz, Temple University PA, EUA e a linhagem celular de endotélio de microvasculatura humano (HMEC1, Ades e col., 1992), doada pelo Dr. Francisco Candal, Emory School of Medicine & CDC, Atlanta, GA, EUA.

3.3 Cultura de células

As células MV3 e NGM foram mantidas na presença do meio de cultura DMEM (Gibco Invitrogen Corporation), suplementado com 3,7 g/L de NaHCO_3 , 5,2 g/L de HEPES,

0,5 U/mL de penicilina, 0,5 mg/mL de estreptomicina e com 10% de FBS (Cultilab) em pH 7,2. As células HMEC1 foram cultivadas sobre gelatina 1% em meio de cultura MCDB-131 (Gibco Invitrogen Corporation) suplementado com NaHCO_3 (14,04 mM), HEPES (15 mM), 60 mg/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hidrocortisona, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de EGF (Gibco Invitrogen Corporation), 2 mM de L-glutamina e com FBS (10%) em pH 7,2. Todas as linhagens foram mantidas em cultura a 5% de CO_2 e temperatura constante de 37°C. As células foram armazenadas em garrafas de cultura (Corning). O meio de cultura foi renovado ou as células foram repicadas, quando confluentes, a cada 2-3 dias. Para repicar as células NGM e HMEC1, foi utilizada uma solução HANK's EDTA (5 mM) para lavar as células, desfazendo as ligações adesivas dependentes de cátions (Ca^{2+} e Mg^{2+}), facilitando, assim, a atuação da tripsina (0,1%)/EDTA (0,01%) para soltar as células do plástico. Já as células MV3 foram lavadas com HANK's e incubadas com HANK's EDTA (5 mM) durante 5 minutos para soltar as células da garrafa. Depois de serem descoladas do plástico da garrafa, as células MV3 foram centrifugadas a 900 rpm e as células HMEC1 e NGM a 1400 rpm durante 10 minutos.

3.4 Contagem de células

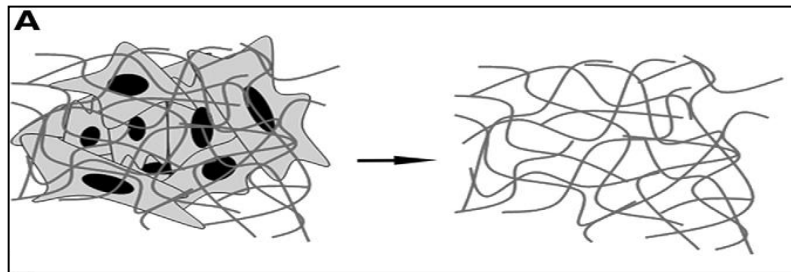
O número de células presentes na suspensão celular foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão por Azul de Tripán (Gibco Invitrogen Corporation) 0,2% em PBS.

3.5 Obtenção da matriz extracelular

As células MV3 e NGM foram semeadas, em meio DMEM e incubadas por diferentes tempos a 37°C e 5% de CO_2 , para a formação de uma matriz uniforme. Após os tempos de incubação, as células foram lavadas com PBS e extraídas, com um tampão de extração, contendo 0,1% de Triton X-100, NH_4OH (0,1 M), 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de coquetel de inibidores (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de aprotinina, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de leupeptina, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de pepstatina e 1 mM de PMSF), para

a retirada do material celular (Figura 12). Posteriormente, os poços contendo a matriz foram lavados, suavemente, três vezes com uma solução de PBS + Ca^{2+} , contendo KCl (2,7 mM), KH_2PO_4 (1,4 mM), NaCl (68,3 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (8 mM), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mM) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 mM), para eliminar restos celulares. Então, as matrizes foram bloqueadas com BSA 0,1% em PBS + Ca^{2+} , 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de coquetel de inibidores e 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de PMSF, como descrito por Morandi e colaboradores (1994). As matrizes foram imediatamente utilizadas para os experimentos.

Figura 12 - Desenho esquemático do processo de obtenção da matriz extracelular



Legenda: A Direita, a matriz extracelular está representada como linhas envolvidas com células, e, à esquerda a matriz extracelular após o procedimento de extração.

Fonte: Soucy e Romer, 2009, f. 274.

3.6 Imunomarcagem da matriz extracelular

As células MV3 e NGM (3×10^5 células/poço) foram distribuídas em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro e mantidas a 37°C e 5% CO_2 durante 72 horas, para adesão. A MEC foi obtida, como descrito, e, em seguida foi lavada com PBS e fixada em 4% de paraformaldeído com 4% de sacarose por 20 minutos. Posteriormente, as matrizes foram lavadas três vezes com PBS e bloqueadas em PBS com BSA 5%, por 30 minutos. Logo depois, foram incubadas, durante 1 hora, com anticorpo primário anti-laminina 1:500 (Sigma), anti-tenascina-c 1:200 (Invitrogen) e anti-fibronectina 1:200 (Invitrogen) em 1% de BSA com PBS. Decorrido esse período, as lamínulas foram lavadas com PBS e incubadas, por 1 hora, com o anticorpo secundário conjugado a biotina, anti-coelho e anti-camundongo 1:400 (Dako) em 1% de BSA com PBS. Após a lavagem com PBS, as células foram incubadas, por 1 hora,

com o Alexa Fluor 555 1:500 (Invitrogen). A MEC foi, então, mais uma vez lavada e as lamínulas foram montadas sobre lâminas utilizando uma solução de n-propilgalacto (20 mM) e 20% de glicerol em PBS. A marcação das proteínas de matriz foi observada utilizando um microscópio de fluorescência invertido (Olympus IX71) em aumento de 20 vezes.

3.7 Análise estrutural da MEC por microscopia eletrônica de varredura

As células MV3 e NGM (5×10^5 células/poço) foram incubadas por 72 horas a 37°C e 5% CO_2 sobre fragmentos de lamínulas tratadas com poli-lisina. Depois, a MEC foi obtida, como descrito acima, e lavada, gentilmente, em PBS a temperatura ambiente, pH 7,2. Posteriormente, foi fixada em 2,5% de glutaraldeído em PBS a 0,1 M, com pH 7,2. Então, as amostras foram lavadas com PBS e fixadas novamente em 1% de OsO_4 por 1 hora, seguido de uma desidratação em concentrações crescentes de etanol, e, secadas, por fim, em CO_2 líquido/gás. A MEC foi, então, revestida com uma camada de 15 nm de espessura de uma liga de ouro e paládio, como descrito por Midlej e colaboradores (2012). As amostras foram observadas com um microscópio eletrônico de varredura JEOL 5800, usando uma aceleração de voltagem de 25 KV. As imagens foram feitas em aumentos de 1000, 4000, 8000 e 30000 vezes.

3.8 Marcação de F-actina nas células HMEC1 sobre as diferentes matrizes

As células MV3 e NGM (1×10^5 células/poço) foram distribuídas em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro e mantidas a 37°C e 5% CO_2 durante 72 horas para adesão. Depois, a MEC foi obtida, como descrito, e, as HMEC1 ($1,5 \times 10^5$ células) foram semeadas sobre essas matrizes, durante 1, 4 ou 24 horas, para a análise da polimerização de F-actina, como descrito por Coelho e colaboradores (2004). Para os experimentos com diferentes concentrações de desintegrinas, as HMEC1 ($1,5 \times 10^5$ ou 2×10^5 células) foram pré-tratadas, por 15 minutos, com as concentrações de 0,5 e 1 μM das desintegrinas ADAM9D, DisBa-01 e Eristostatina. Então, as células foram semeadas sobre essas matrizes ou sobre a gelatina,

durante 1 hora. As células presentes no sobrenadante foram centrifugadas e diluídas em 0,2% de azul de tripan, para a contagem, em câmera de Neubauer, das células que não aderiram à lamínula. No pós-tratamento, as HMEC1 ($1,5 \times 10^5$ células) foram semeadas sobre as matrizes, por 1 hora, e depois foram tratadas, por 30 minutos, com a concentração de $0,5 \mu\text{M}$ de ADAM9D e $0,5 \mu\text{M}$ de DisBa-01.

Em seguida, as células foram lavadas com PBS e fixadas em paraformaldeído com 4% de sacarose em PBS por 20 minutos. Posteriormente, foram lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 0,2% em PBS por 5 minutos, e, novamente lavadas com PBS. Logo depois, para a marcação da actina polimerizada, as células foram incubadas, durante 2 horas, com faloidina conjugada a rodamina 1:500 (Sigma). Decorrido esse período, as lamínulas foram lavadas com PBS, e montadas sobre lâminas utilizando $5 \mu\text{L}$ de DAPI prolong (Invitrogen), para a marcação nuclear. A distribuição de F-actina foi observada utilizando um microscópio de fluorescência invertido (Olympus IX71) em aumento de 60 e 100 vezes.

3.9 Eletroforese e western blotting

Para a determinação da fosforilação de FAK (pFAK Tyr³⁹⁷) e da fosforilação de AKT (pAKT Ser⁴⁷³), foi utilizada a técnica de western blotting, descrita por Nascimento-Silva e colaboradores (2007). As células MV3 e NGM (5×10^5 células/poço) foram distribuídas em placas de 6 poços e mantidas a 37°C e 5% CO_2 , durante 72 horas. Depois, a MEC foi obtida, como descrito, e as HMEC1 (5×10^5 células/poço) foram semeadas sobre essas matrizes, durante 1, 6 ou 24 horas. Após as incubações, as células foram lisadas em tampão de lise RIPA (Tris (50 mM), pH 8, NaCl (150 mM), 1% de Triton X-100, 0,1% de SDS, EDTA (5 mM), NaF (50 mM), NaH_2PO_4 (30 mM), Na_3VO_4 (100 mM), PMSF (1 mM) e coquetel de inibidores), seguidas de uma centrifugação de 13.000 rpm por 5 minutos, no qual o *pellet* foi descartado, para a retirada das proteínas de matriz extracelular. O conteúdo de proteínas do extrato total foi determinado pelo método de BCA (Thermo Scientific). Às amostras, foram adicionados 20% do seu volume de tampão de amostra 5 vezes concentrado (Tris-HCl (50 mM) com pH 6,8, 1% de SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol e 5% de β -mercaptoetanol), desnaturando-as, e, posteriormente, as amostras foram fervidas por 5

minutos. O volume dos extratos celulares correspondentes a 30 µg de proteína foram fracionados por eletroforese em gel desnaturante com 10% de poliacrilamida (SDS-PAGE). Após 90 minutos de eletroforese a 150 V e 25 mA, as proteínas no gel foram transferidas para membranas de PVDF (Amersham Biosciences) por eletrotransferência (100V) submersa, em piscina (Mini Trans-Blot Cell- Bio-Rad), durante 1 hora. A eficiência da transferência foi avaliada pela coloração da membrana com o vermelho de Ponceau. Após a lavagem em água destilada, para retirada do corante, a membrana foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação, e *overnight* a 4°C com solução de bloqueio contendo BSA 5%, Tween-20 0,5% em PBS (T-PBS). Em seguida, as membranas foram incubadas 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação, e *overnight* a 4°C com anticorpo primário anti-pFAK (fosforilada no resíduo 397) (1:500) e anti-pAKT (1:500) diluído em T-PBS contendo BSA 2%. Após a incubação, as membranas foram lavadas com T-PBS (3 vezes por 10 minutos) e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho conjugado à biotina (diluído 1:10.000 em T-PBS) por 1 hora, sob agitação. As membranas foram então lavadas (3 vezes por 10 minutos) e incubadas com streptavidina conjugada à peroxidase (1:10.000), durante 1 hora, sob agitação. As membranas foram, então, lavadas, secadas e incubadas com solução de quimioluminescência (kit ECL Prime Western Blotting Detection Reagent- GE Healthcare). As bandas imunorreativas foram visualizadas por ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). As imagens foram analisadas com o software ImageJ. O mesmo procedimento foi utilizado para a detecção da expressão de FAK (anticorpo primário 1:500 em 2% de BSA e anticorpo secundário anti-coelho 1:10.000) e AKT (anticorpo primário 1:1.000 em 2% de BSA e anticorpo secundário anti-cabra 1:10.000) totais, usadas como *load* do experimento.

3.10 Imunoprecipitação

Foi analisada a associação de FAK e Src por imunoprecipitação, como descrito por Nascimento-Silva e colaboradores (2007). As células MV3 e NGM (5×10^5 células/poço) foram distribuídas em placas de 6 poços e mantidas a 37°C e 5% CO₂, durante 72 horas. Depois, a MEC foi obtida, como descrito, e, as HMEC1 (5×10^5 células/poço) foram semeadas sobre essas matrizes, durante 24 horas. Após a incubação, as células foram lisadas em tampão de lise (Tris-HCl (50 mM), pH 7,4, NaCl (150 mM), MgCl₂ (1,5 mM), EDTA (1,5 mM), 1%

de Triton X-100, 10% de glicerol, 10 µg/mL de aprotinina, 10 µg/mL de leupeptina, 2 µg/mL de pepstatina e 1 mM de PMSF), para a obtenção do extrato celular, que foi incubado *overnight* com anticorpo anti-FAK 1:200 (Santa Cruz) a 4°C, no gelo. Logo após, o extrato foi imunoprecipitado com a proteína A/G agarose (20 µL/amostra - Santa Cruz), durante 2 horas a 4°C, sob agitação. Então, as células foram centrifugadas a uma velocidade de 13000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspenso em 50 µL de tampão de amostra 5 vezes concentrado (Tris-HCl a 50 mM com pH 6,8, 1% de SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol e 5% de β-mercaptoetanol). Posteriormente, as amostras foram fervidas por 5 minutos. Os imunoprecipitados foram analisados por western blotting, utilizando os anticorpos anti-FAK (anticorpo primário 1:500 em T-PBS e BSA 2%- Santa Cruz- e anticorpo secundário anti-coelho 1:10.000) e anti-cSrc (anticorpo primário 1:500 em T-PBS e BSA 2% - Santa Cruz- e anticorpo secundário anti-coelho 1:10.000). Após a incubação com a estreptavidina conjugada à peroxidase (1:10.000), as membranas foram lavadas, secadas e incubadas com solução de quimioluminescência (kit ECL Prime Western Blotting Detection Reagent- GE Healthcare). As bandas imunorreativas foram visualizadas por ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad). As imagens foram analisadas com o software ImageJ. A FAK foi utilizada como *load* do experimento.

3.11 Expressão de mRNA (qRT-PCR)

As células HMEC1 (5×10^5) foram incubadas durante 8 e 24 horas, a 37°C e 5% CO₂, sobre as matrizes obtidas através das células MV3 e NGM. Posteriormente, o RNA total foi isolado de células HMEC1 utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen). As amostras de RNA foram estocadas em freezer -80°C até o uso. A qualidade e a quantidade de RNA nas amostras foram analisadas por absorvância em NanoVue Plus (GE Healthcare). As amostras de RNA (concentração de 100 ng), foram retro-transcritas em DNA complementar utilizando-se o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). As amostras de DNA complementar foram estocadas em freezer -20°C até o momento de uso. O cDNA foi amplificado com o uso de *primers* baseados na sequência de *Hs_FLT1_1_SG* (Qiagen n° cat.: QT00073540), *Hs_KDR_1_SG* (Qiagen n° cat.: QT00069818), e *Hs_GAPDH_1_SG* (Qiagen n° cat.: QT00079247). O nível de expressão de cada gene analisado foi normalizado contra o

GAPDH. A expressão relativa foi determinada pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que representa o valor da expressão de genes analisados com os mesmos calibradores.

O qPCR foi realizado em Rotor Gene Q e os *amplicons* foram quantificados pelo sistema de fluorescência SYBR-green (Qiagen). A condição padrão da reação de PCR foi: 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C (5 segundos) e 60°C (10 segundos), seguido por uma curva-padrão de desnaturação.

3.12 Fosforilação do receptor do VEGF (VEGFR2)

Para análise da fosforilação do receptor do VEGF, as células MV3 e NGM (5×10^5 células/poço) foram distribuídas em placas de 6 poços e mantidas a 37°C e 5% CO₂, durante 72 horas. Depois, a MEC foi obtida, como descrito, e, as HMEC1 (3×10^5 células/poço) foram semeadas sobre essas matrizes, durante 24 horas em meio com 10% de FBS a 37°C e 5% CO₂. No dia seguinte, as células foram incubadas com meio 1% de FBS, por 8 horas. Depois, incubadas com 50 ng/mL de VEGF, durante 10 minutos na ausência de soro fetal bovino. Logo após, o sobrenadante foi retirado e a monocamada foi lisada em tampão de lise (HEPES (10 mM), pH 7,4; NaCl (150 mM), 1% de Triton X-100, NaF (20 mM), Na₃VO₄ (1 mM) e coquetel de inibidores de protease), para a posterior dosagem das proteínas pelo método de BCA. As amostras foram, então, submetidas à eletroforese SDS-PAGE, seguida da eletrotransferência em membranas de PVDF. A membrana foi bloqueada com salina tamponada em Tris (TBS), pH 7,6 contendo 0,1% de Tween 20, durante 24 horas. As membranas foram incubadas com o anticorpo primário para pVEGFR2 Tyr¹¹⁷⁵ (1:500), diluído em T-PBS, *overnight* a 4°C, seguido da incubação com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado à biotina (1:1.000), por 1 hora. As membranas foram, lavadas, secadas e incubadas com solução de quimioluminescência (kit ECL Prime Western Blotting Detection Reagent- GE Healthcare). As bandas imunorreativas foram visualizadas por filmes. As imagens foram obtidas por escaneamento dos filmes e analisadas com o software ImageJ. O mesmo procedimento foi utilizado para a detecção da expressão de Tubulina (anticorpo primário 1:1.000 e anticorpo secundário anti-cabra 1:1000), usada como *load* do experimento.

3.13 *Wound healing*

Células MV3 e NGM ($1,5 \times 10^5$ células/ poço) foram semeadas em placas de 24 poços e mantidas a 37°C e 5% CO₂, durante 72 horas. Enquanto isso, 24 horas antes do experimento, uma garrafa pequena de células endoteliais foi incubada com meio 2% completo para que houvesse a sincronização do ciclo celular. Após a obtenção da MEC, como descrito, as HMEC1 (3×10^5 células/poço) foram semeadas sobre essas matrizes e sobre a gelatina, durante 3 horas, a 37°C e 5% CO₂, para a adesão. Depois, as células foram tratadas com mitomicina C a 5 µg/mL (Sigma), durante 2 horas. Então, as células HMEC1 foram incubadas, durante 30 minutos, na presença e na ausência de diferentes concentrações de desintegrinas: ADAM9D (0,5 µM), DisBa-01 (0,5 µM) e Eristostatina (1 µM), diluídos em meio de cultura suplementado 2% com FBS. Com o auxílio de uma ponteira de pipeta, foram realizados riscos nos poços das placas de 24 poços. O ensaio de cicatrização ocorreu durante 16 horas. A partir disso, foram feitas fotos dos riscos nos tempos de 0 e 16 horas, em microscópio invertido (Olympus IX71), no aumento de 4 e 10 vezes. As áreas de fechamento foram analisadas no Adobe Photoshop 6,0 (Barcellos-de-Souza e col., 2013)

3.14 **Tratamento estatístico**

Os resultados obtidos são expressos como média e desvio padrão da média. Os dados foram analisados por teste t de Student, com auxílio do programa GraphPad Prism 4 para Windows, do Microsoft Excel 2007 e do Adobe Photoshop 5. Foram consideradas significativas diferenças onde $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

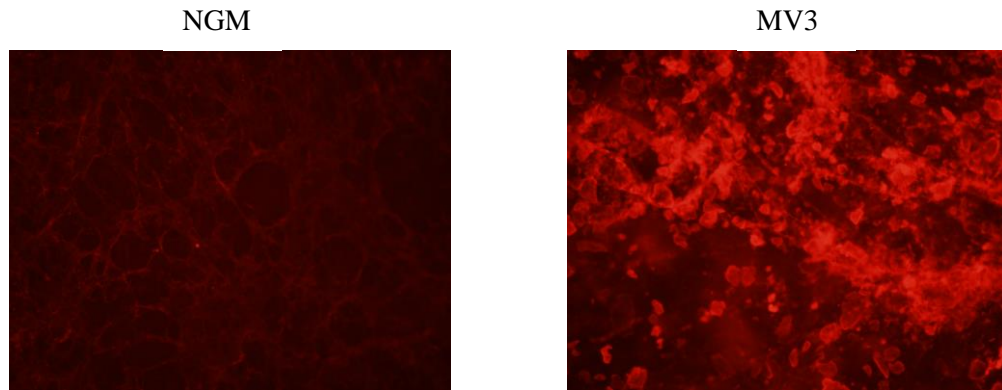
4.1 Organização estrutural das matrizes obtidas das células MV3 e NGM.

Nosso grupo já tinha visto, através de um ELISA qualitativo, a proporção de algumas proteínas de matriz presentes na MEC produzida pela MV3 em relação às proteínas presentes na MEC produzida pela NGM. A matriz do melanoma apresentava significativamente mais laminina (18 vezes mais) e tenascina-C (8 vezes mais), comparadas à MEC do melanócito. Além disso, a matriz do melanoma apresentava menos fibronectina do que a matriz do melanócito (Brandão-Costa RM, 2011). Dessa forma, investigamos se haveria diferenças estruturais na MEC do melanoma e do melanócito que justificariam as diferentes respostas das células endoteliais sobre a MEC da MV3, em comparação à MEC da NGM. Para isso, avaliamos, por imunomarcagem da matriz, as diferenças na organização das proteínas de matriz que se diferenciaram mais entre as duas matrizes. Após 72 horas, a matriz obtida das células NGM e MV3 foi extraída, e marcada com anticorpos específicos para as proteínas de matriz: laminina, tenascina-C e fibronectina. As três proteínas se organizaram de forma diferente em cada matriz, e a MEC do melanoma apresentava uma maior marcação de laminina (painel A) e tenascina-C (painel B) e uma menor marcação de fibronectina (painel C), comparada à matriz do melanócito, corroborando com o resultado visto anteriormente (Figura 13).

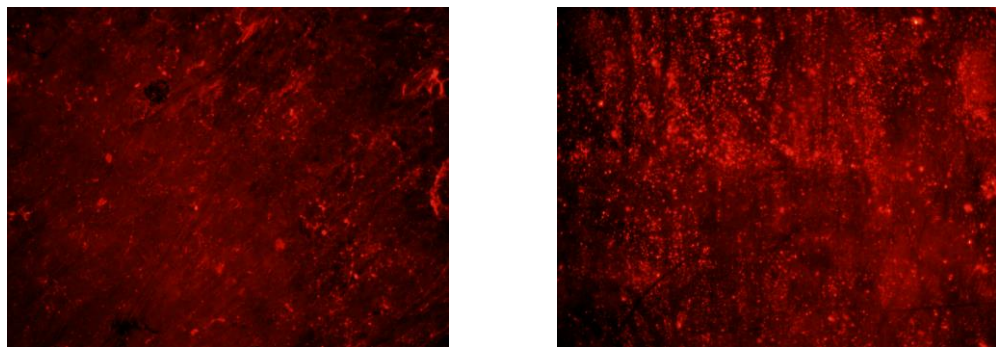
Além disso, analisamos as diferenças estruturais entre as duas MEC utilizando microscopia de varredura. Pudemos constatar que a matriz produzida pela NGM tem uma característica fibrosa e densa. Em contrapartida, a MEC produzida pela MV3 é mais fina e porosa, o que pode conferir a essa matriz uma maior permeabilidade, facilitando a penetração celular, além de apresentar uma organização em feixes paralelos (Figura 14).

Figura 13 - Imunomarcação das proteínas fibronectina, tenascina-C e laminina na MEC da MV3 e da NGM

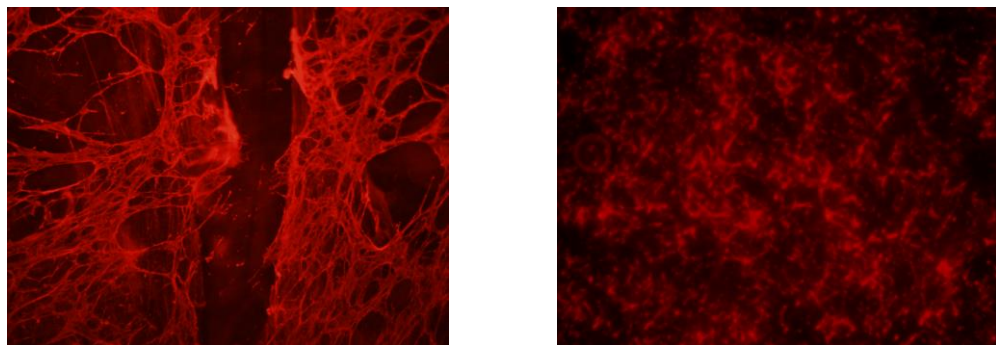
A



B

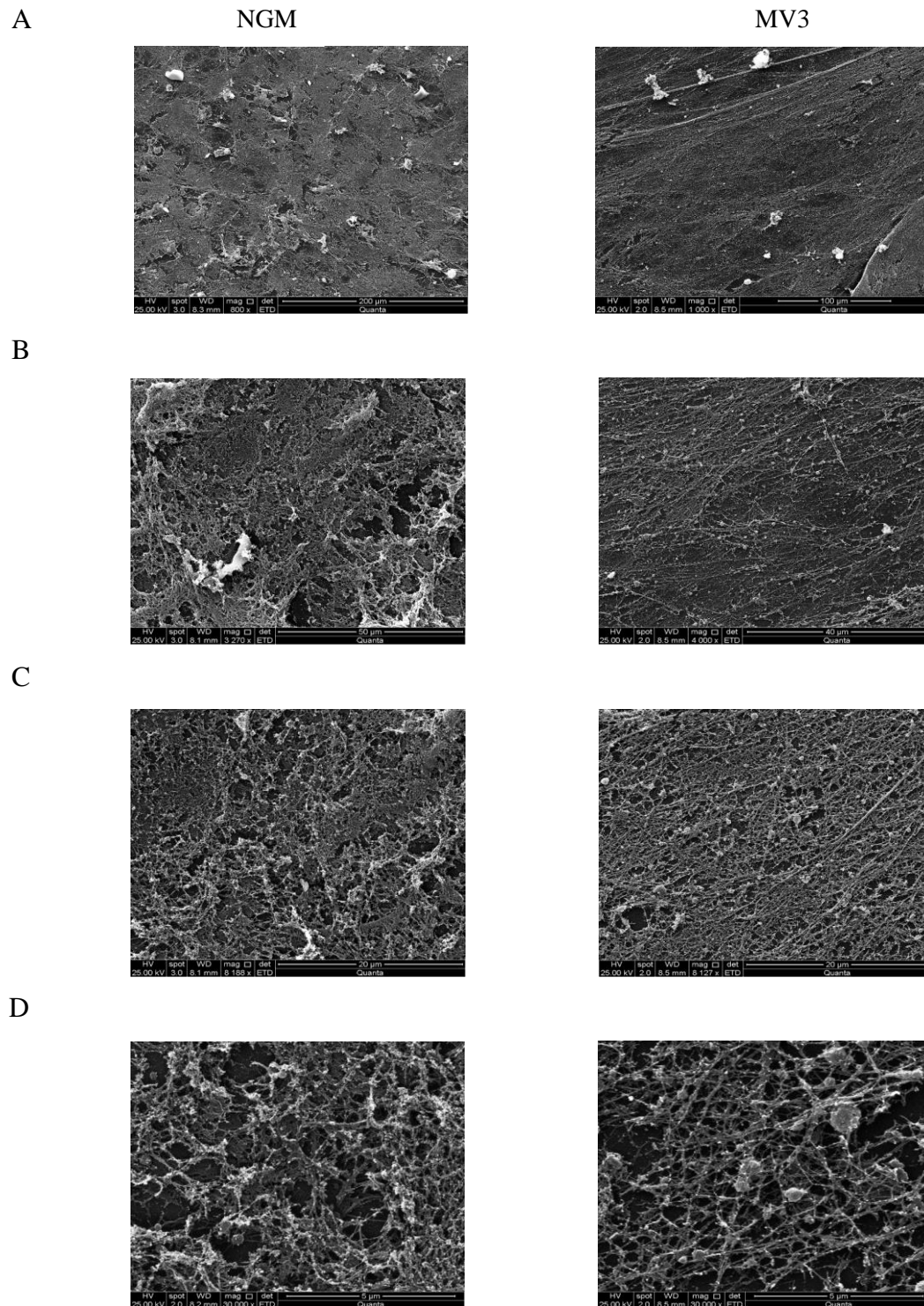


C



Legenda: Matriz extracelular produzida pelas células MV3 e NGM, durante 72 horas. Imunomarcação das proteínas de matriz (A) Laminina, (B) Tenascina-C e (C) Fibronectina. A esquerda: imagens da MEC da NGM e a direita: imagens da MEC da MV3. As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência invertido em aumento de 20 vezes. As imagens são representativas de 3 experimentos independentes.

Figura 14 – Microscopia eletrônica de varredura da MEC da MV3 e da NGM



Legenda: Matriz extracelular produzida pelas células MV3 e NGM, durante 72 horas. As imagens foram feitas em microscópio eletrônico de varredura, nos aumentos de (A) 1000 vezes, (B) 4000 vezes, (C) 8000 vezes e (D) 30000 vezes. As imagens são representativas de 3 experimentos independentes.

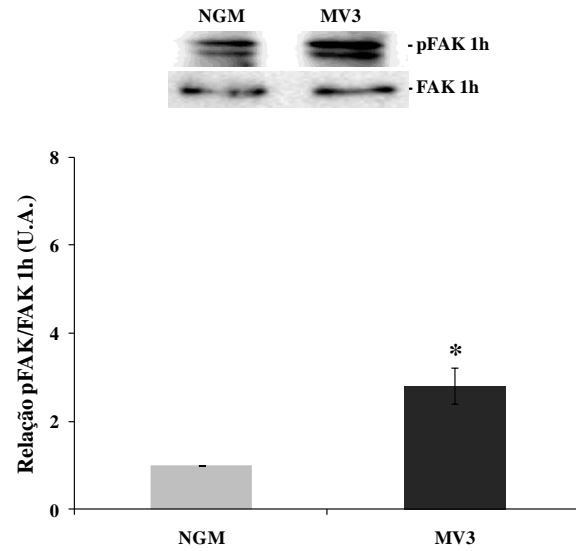
4.2 Efeito da MEC da MV3 sobre a ativação de vias dependentes de integrinas nas HMEC1.

Já foi visto que a matriz da MV3 aumenta a adesão, migração, proliferação e tubulogênese das células endoteliais, quando comparamos à matriz da NGM (Brandão-Costa RM, 2011). Como a participação de integrinas durante o desenvolvimento tumoral, regulando os eventos relacionados à angiogênese, é bem descrita (Brown e col., 2008), estudamos a participação das vias intracelulares dependentes de integrinas em nosso modelo. A ativação de integrinas induz a autofosforilação de FAK, ativando vias de sinalização intracelulares envolvidas em importantes processos biológicos como migração e adesão celular (Guan, 2010). Portanto, analisamos, por western blotting, a fosforilação de FAK nas células endoteliais sobre a matriz da MV3 e da NGM. Observamos que a matriz tumoral aumentou significativamente a expressão de FAK fosforilada, nas HMEC1 cultivadas por 1 e 24 horas sobre essa MEC, quando comparada à MEC da NGM (Figura 15). Esse resultado sugere a participação de integrinas regulando esses eventos.

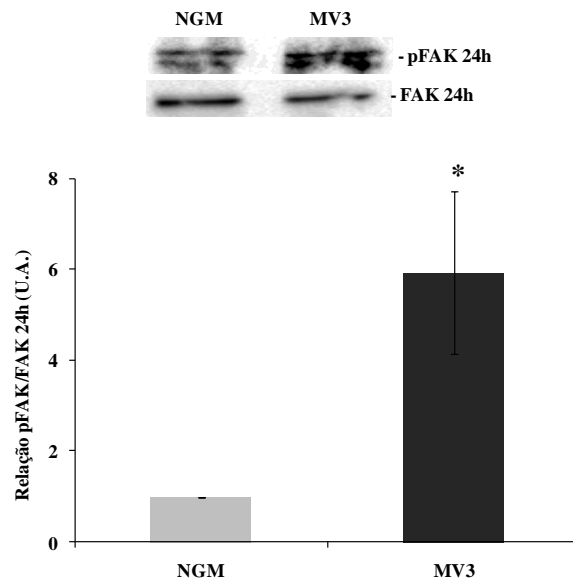
A ativação de integrinas e a posterior ativação de FAK promovem a reorganização dos filamentos de actina, o que reforça a ligação com a MEC e forma os pontos de adesões focais (Hynes, 2002; Bolós e col., 2010). Portanto, para confirmar a possibilidade de participação de integrinas, realizamos uma citoquímica para analisar a polimerização de F-actina nas células HMEC1 semeadas 4 e 24 horas sobre a MEC tumoral e da NGM. Vimos que as células endoteliais semeadas sobre a MEC da NGM, nos tempos de 4 e 24h, apresentaram um fenótipo transitório, uma vez que visualizamos algumas células com lamelipódio, mas também observamos poucas células com fibras de estresse no citosol. Entretanto, as HMEC1 semeadas sobre a MEC tumoral, tanto no tempo de 4 (Figura 16, coluna esquerda) quanto no tempo de 24 horas (Figura 16, coluna direita), tiveram aumento na marcação de F-actina, presença de fibras de estresse e de pontos de adesão focal, além de diminuição na actina cortical, quando comparadas à MEC da NGM.

Figura 15 – Fosforilação de FAK nas células endoteliais sobre as diferentes matrizes

A

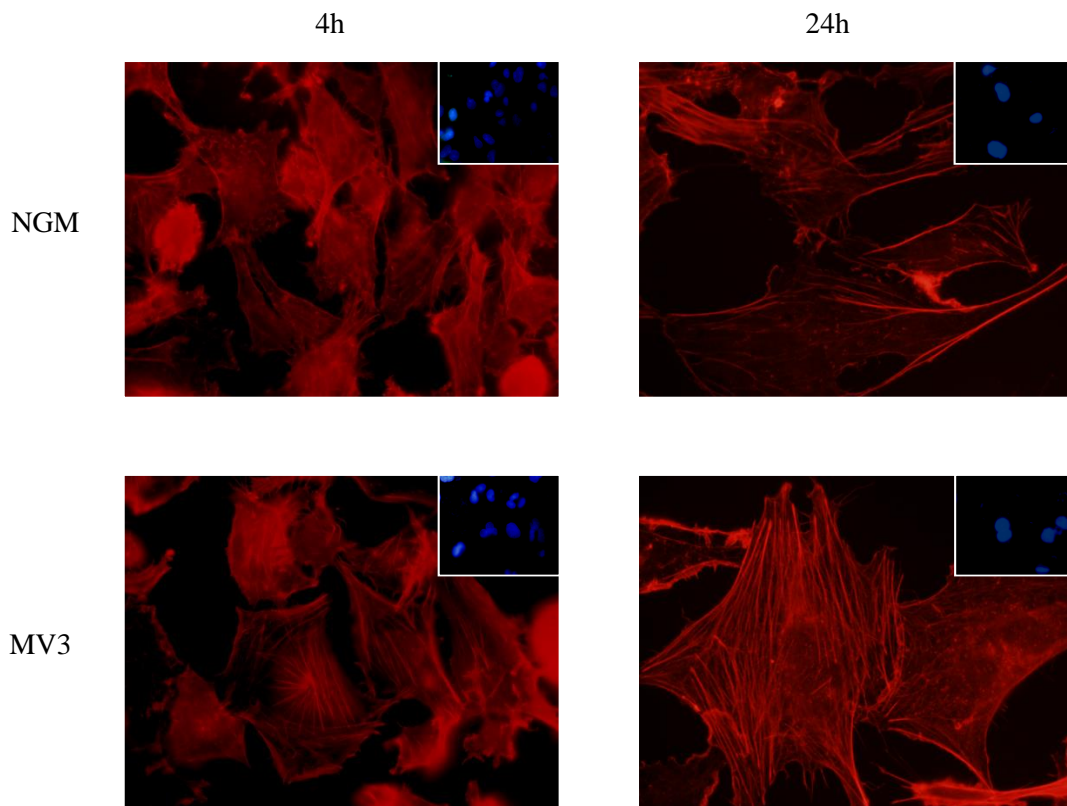


B



Legenda: Células MV3 e NGM foram cultivadas por 72 horas. Depois, a MEC foi obtida e as HMEC1 (5×10^5) foram semeadas sobre as matrizes durante 1 hora (A) e 24 horas (B). As células foram lisadas e a fosforilação de FAK foi determinada por western blotting. A imagem é representativa e os gráficos representam a média \pm D.P. de 3 experimentos independentes. $P < 0,05$.

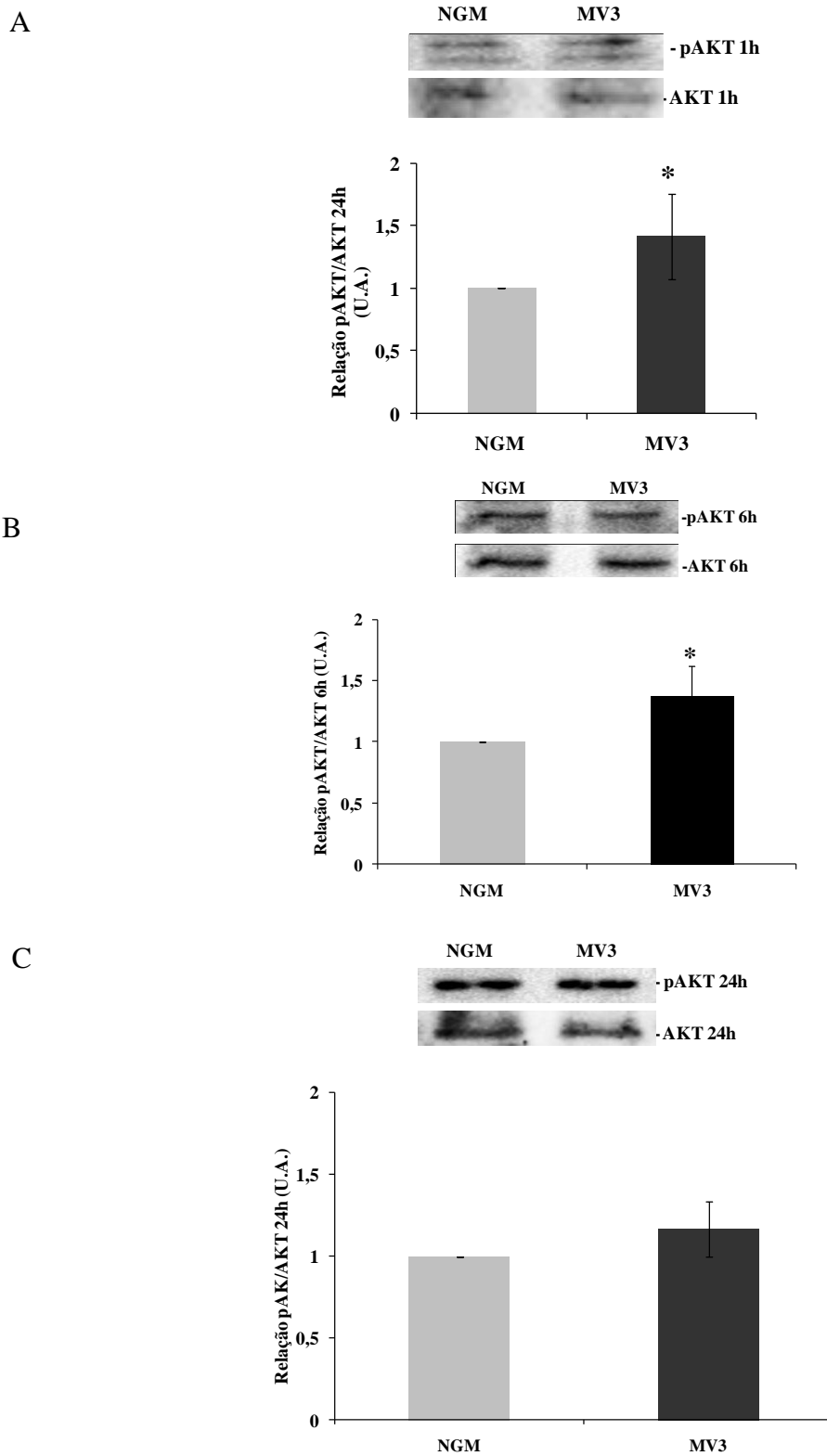
Figura 16 – Marcação de f-actina nas células endoteliais sobre as diferentes matrizes



Legenda: MV3 e NGM foram semeadas por 72 horas. Após a extração da MEC, as HMEC1 ($1,5 \times 10^5$) foram semeadas sobre as matrizes durante 4 (coluna esquerda) e 24 horas (coluna direita). As células foram fixadas e marcadas com faloidina conjugada a rodamina. As imagens foram capturadas em microscópio invertido em aumento de 60 vezes. As imagens são representativas de 3 experimentos independentes.

A autofosforilação de FAK provoca a mudanças na organização do citoesqueleto de actina, podendo ativar vias que promovem o aumento da proliferação e migração celular, como, por exemplo, a via da PI3K/AKT (Guan, 2010; Martini e col., 2013). Dessa forma, como vimos um aumento da transmigração das células endoteliais através da MEC tumoral (Brandã-Costa RM, 2011), fomos avaliar, por western blotting, se essas células endoteliais sobre a MEC da MV3 também apresentavam um aumento da fosforilação de AKT. Corroborando com o aumento da transmigração, as HMEC1 apresentaram um aumento significativo na fosforilação de AKT quando semeadas por 1 e 6 horas sobre a MEC da MV3 (Figura 17, painel A e B), e uma tendência de aumento em 24 horas (Figura 17, painel C), comparado à MEC da NGM.

Figura 17 – Fosforilação de AKT nas células endoteliais sobre as diferentes matrizes



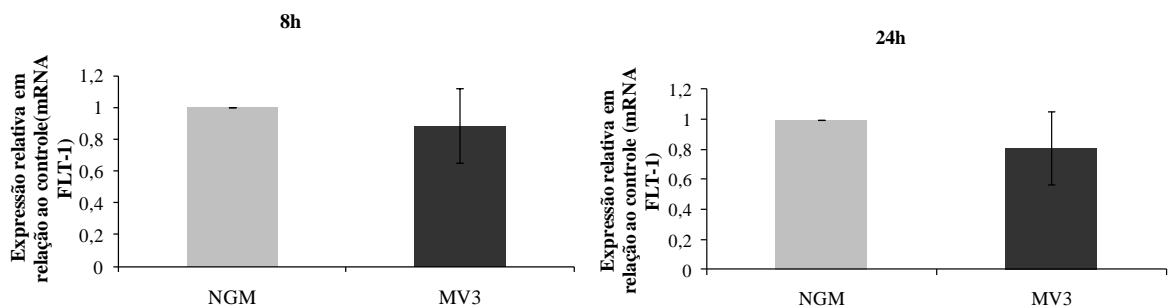
Legenda: Células MV3 e NGM foram cultivadas por 72 horas. Depois, a MEC foi obtida e as HMEC1 (5×10^5) foram semeadas sobre as matrizes durante 1 hora (A), 6 horas (B) e 24 horas (C). As células foram lisadas e a fosforilação de AKT foi determinada por western blotting. A imagem é representativa e os gráficos representam a média \pm D.P. de 3 experimentos independentes. $P < 0,05$.

4.3 Efeito da MEC da MV3 sobre a expressão de VEGFR1 e VEGFR2 nas HMEC1

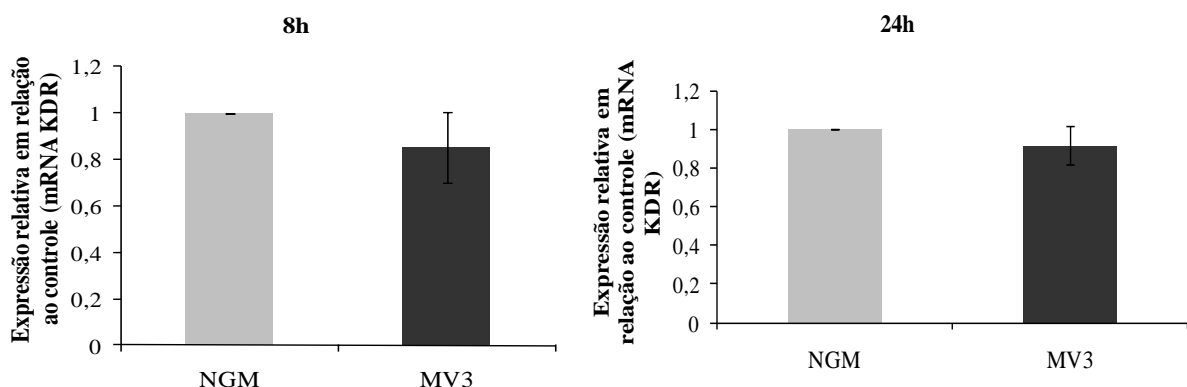
Além do aumento da migração, o nosso grupo observou que a MEC tumoral também foi capaz de aumentar a tubulogênese das células endoteliais, comparada à MEC da NGM (Brandão-Costa RM, 2011). Por isso, resolvemos analisar se a MEC tumoral poderia induzir um aumento da expressão de receptores de VEGF nas células endoteliais cultivadas sobre essa matriz. Para isso, analisamos, por qRT-PCR, a expressão de mRNA para VEGFR1 e VEGFR2 nas células endoteliais que foram cultivadas por 8 e 24 horas na matriz tumoral. Vimos que a expressão de mRNA para VEGFR1 (FLT-1) (Figura 18, painel A) e VEGFR2 (KDR) (Figura 18, painel B) não teve nenhuma alteração nas MEC da NGM e da MV3 nos dois tempos avaliados.

Figura 18 – Expressão de mRNA para VEGFR1 e VEGFR2 nas HMEC1 sobre as diferentes matrizes

A



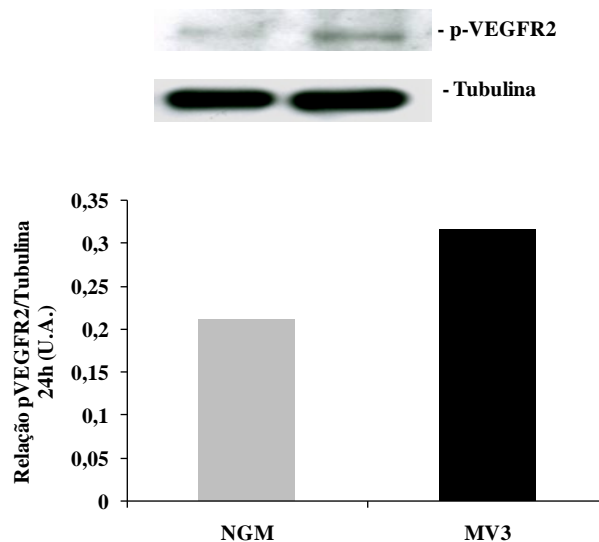
B



Legenda: Células MV3 e NGM foram cultivadas por 72 horas. Depois, a MEC foi obtida e as HMEC1 (5×10^5) foram semeadas sobre as matrizes durante 8 e 24 horas. O mRNA foi extraído e retrotranscrito em cDNA, que foi amplificado por qPCR em tempo real, utilizando *primers* para Flt-1 (A) e KDR (B). A expressão de GAPDH foi utilizada como controle do experimento. Os gráficos representam a média \pm D.P. de 3 experimentos independentes.

Como vimos, a matriz tumoral não aumentou a expressão de mRNA para VEGFR1 ou 2 nas HMEC1, comparada às outras matrizes, porém essa matriz foi capaz de aumentar a tubulogênese das células endoteliais. Trabalhos recentes mostram que uma vez ativadas, as integrinas podem transativar de dentro para fora (sinalização *inside-out*) o receptor do VEGF, favorecendo a angiogênese (Eliceiri, 2001; Somanath e col., 2009; Koch e col., 2011). Como já havíamos mostrado que a adesão das células endoteliais à matriz do melanoma causava uma maior ativação nas vias de sinalização associadas às integrinas (Figuras 15 e 17), avaliamos se esta atividade poderia estar relacionada a um aumento da sensibilidade da resposta dessas células ao VEGF. Para tanto, células endoteliais foram semeadas, por 24 horas, sobre a matriz do melanoma ou do melanócito e, depois, estimuladas com 50 ng/mL de VEGF por 10 minutos. Através de western blotting, vimos que as HMEC1 semeadas sobre a MEC da MV3 apresentaram uma maior fosforilação do VEGFR2, quando comparadas às células semeadas sobre a MEC da NGM (Figura 19). Esses dados sugerem uma possível transativação de vias de sinalização dependentes de integrinas e o VEGFR2, o que poderia justificar o aumento da tubulogênese nas células endoteliais que entram em contato com a matriz tumoral.

Figura 19 – Fosforilação de VEGFR2 nas HMEC1 sobre as diferentes matrizes

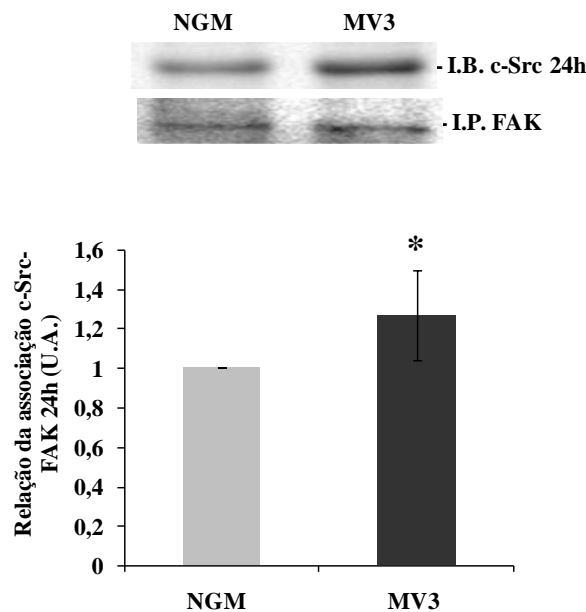


Legenda: Células MV3 e NGM foram cultivadas por 72 horas. Depois, a MEC foi obtida e as HMEC1 (3×10^5) foram semeadas sobre as matrizes durante 24 horas. As células foram tratadas com 50ng/mL de VEGF e a expressão de VEGFR2 fosforilado foi determinada por westerblotting. A imagem e o gráfico são representativos de 1 experimento.

4.4 Efeito da MEC da MV3 sobre a associação de c-Src-FAK nas células endoteliais

Evidências têm mostrado, em células vasculares, que a transativação entre integrinas e VEGFR seria mediada pela c-Src (Somanath e col., 2009). A associação da c-Src à FAK está intimamente ligada à ativação de ambas as vias, a partir da interação de integrinas com a MEC (Eliceire, 2001; Somanath e col., 2009; Galvagni e col., 2010). Dessa forma, investigamos a associação c-Src-FAK nas células endoteliais que foram crescidas sobre a MEC tumoral, e observamos que a matriz tumoral aumentou significativamente a associação de FAK à c-Src nas células endoteliais, comparada à associação na matriz do melanócito (Figura 20).

Figura 20 – Associação de FAK-cSrc nas HMEC1 sobre as diferentes matrizes



Legenda: Células MV3 e NGM foram cultivadas por 72 horas. Depois, a MEC foi obtida e as HMEC1 (5×10^5) foram semeadas sobre as matrizes durante 24 horas. As células foram lisadas e a associação de FAK à Src foi determinada por imunoprecipitação. A imagem é representativa e os gráficos representam a média \pm D.P. de 3 experimentos independentes. $P < 0,05$.

Os dados apresentados até esse momento já estão em forma de artigo a ser submetido para a publicação na revista Matrix Biology, que é indexada, qualis A e possui atualmente fator de impacto 3,199. O artigo encontra-se como apêndice ao final dessa dissertação.

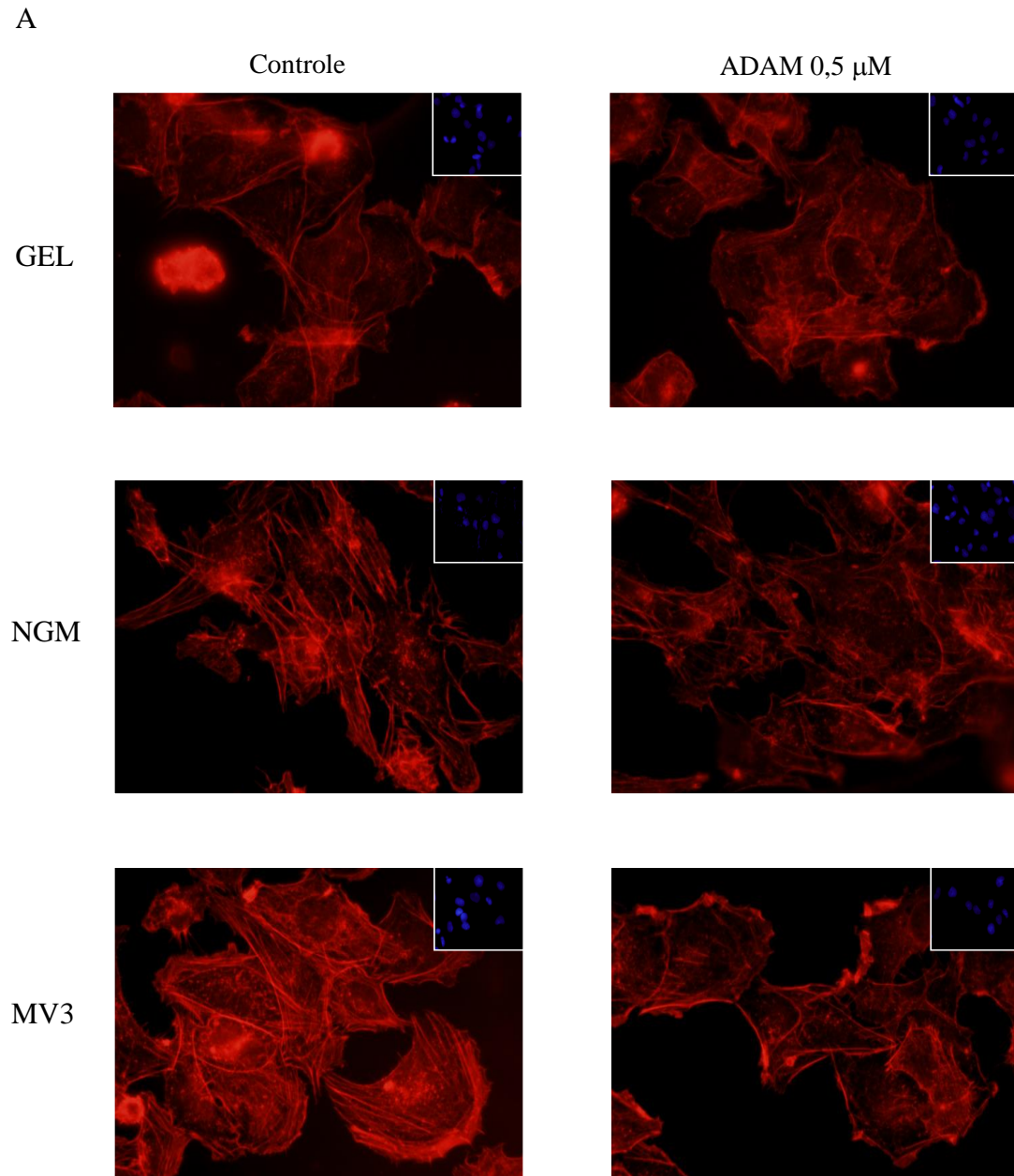
4.5 Efeito das desintegrinas sobre a organização de F-actina nas HMEC1 sobre as diferentes matrizes

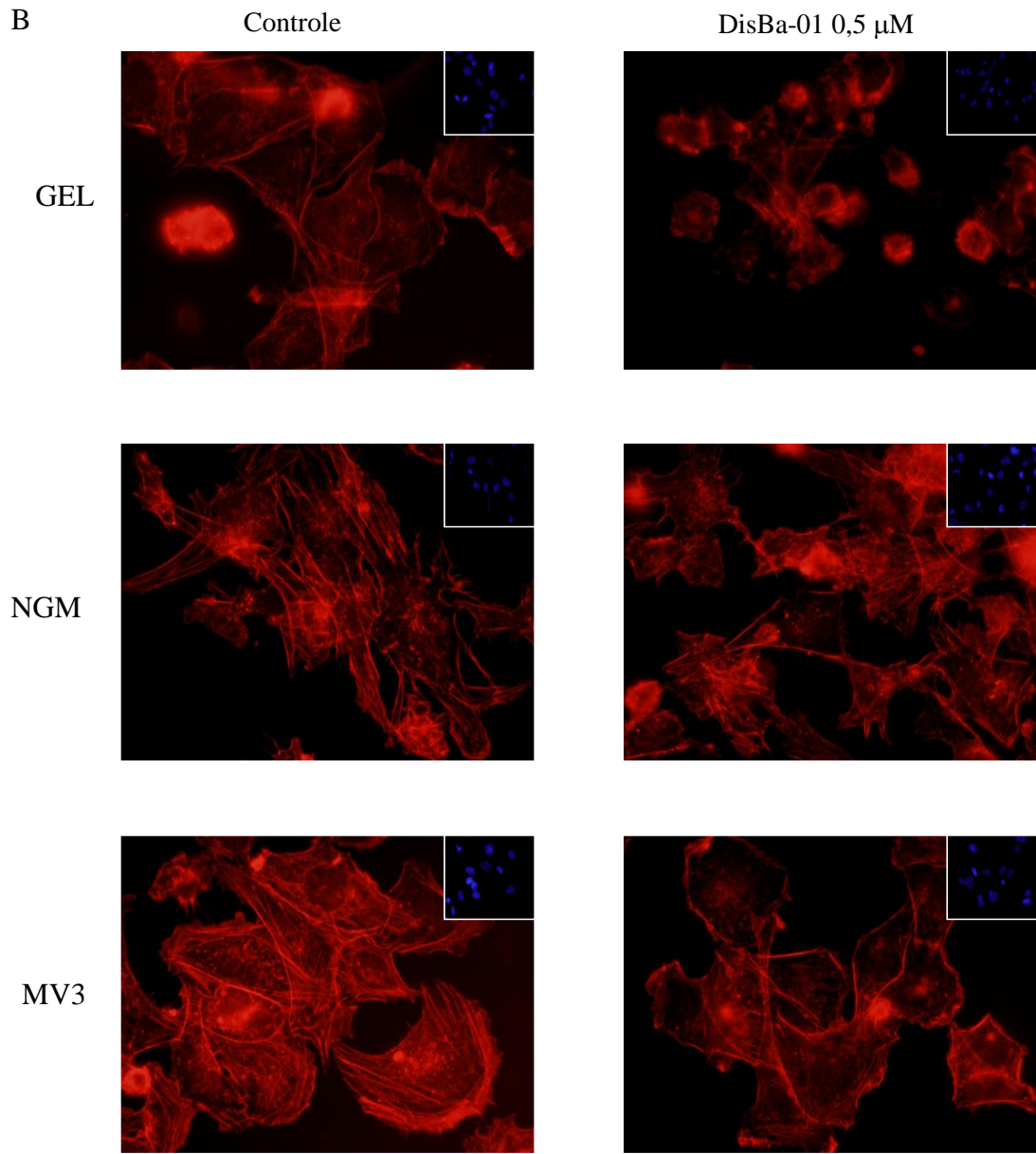
Como vimos, a matriz tumoral foi capaz de aumentar a formação de fibras de estresse nas células endoteliais (Figura 16) e esse efeito pode ser modulado por integrinas. Como as desintegrinas são capazes de se ligar seletivamente à integrinas, interferindo em suas sinalizações intracelulares responsáveis, por exemplo, pela polimerização e organização da actina (Selistre-de-Araujo e col., 2010).

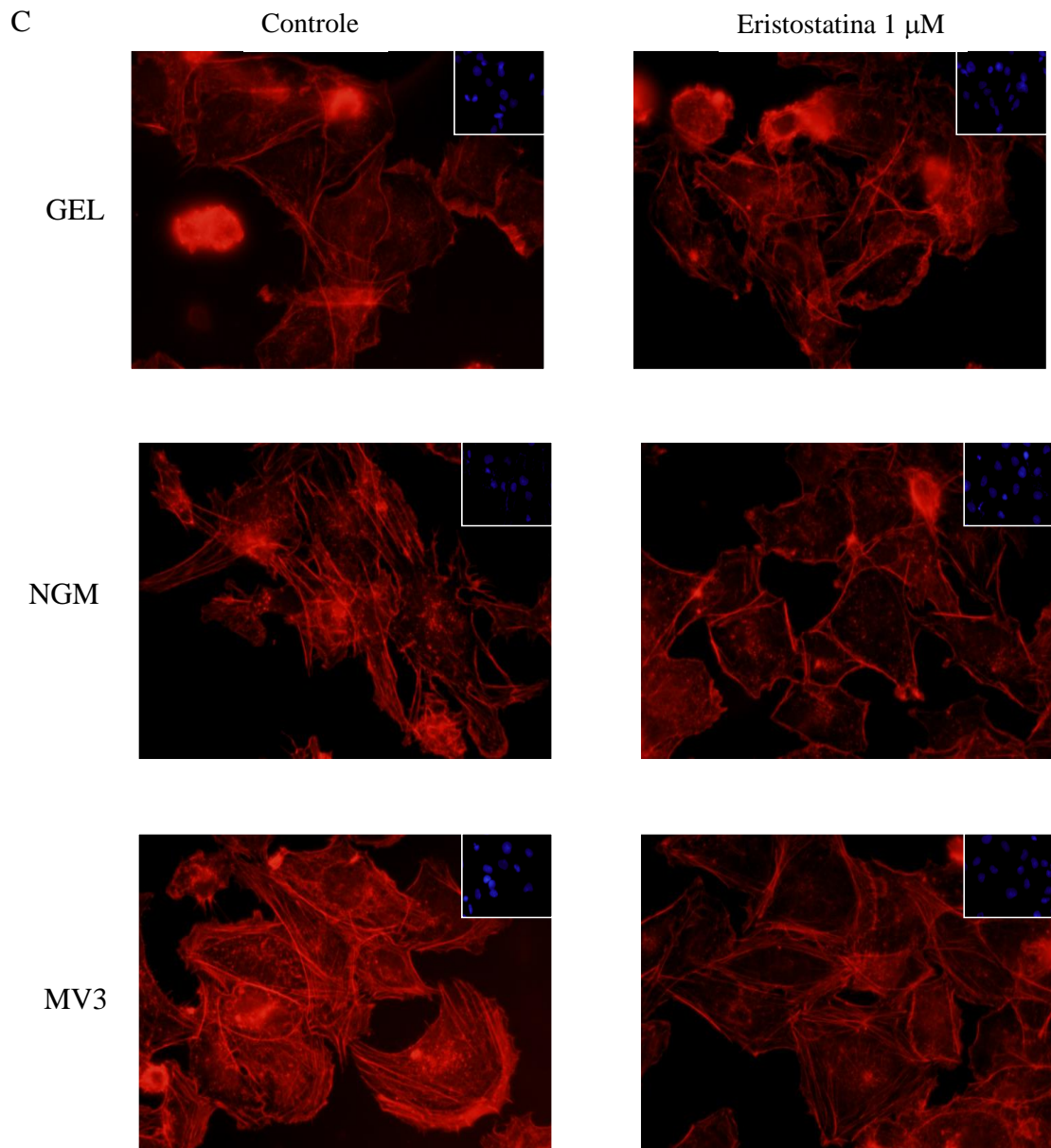
Partindo desse conhecimento, fomos avaliar quais desintegrinas teriam um potencial efeito sobre a distribuição de F-actina nas células endoteliais, a fim de utilizarmos essas desintegrinas como ferramentas em estudos sobre os mecanismos moleculares e celulares desencadeados a partir das interações integrina-célula endotelial. Para tanto, avaliamos a dinâmica do citoesqueleto de actina das células endoteliais que foram pré-tratadas com as desintegrinas ADAM9D, DisBa-01, Eristostatina, Alternagina-C, Kistrina e Flavoridina, utilizadas em duas concentrações (0,5 e 1 μM). A figura 21 mostra que o pré-tratamento das células endoteliais com 0,5 μM de ADAM9D (painel A), 0,5 μM de DisBa-01 (painel B) e 1 μM de Eristostatina (painel C), levou à alterações significativas na dinâmica do citoesqueleto de actina, com diminuição da polimerização de actina e da formação de fibras de estresse nas células semeadas sobre a MEC tumoral, quando comparadas à matriz da NGM ou da gelatina. Não ocorreram alterações significativas nos outros grupos testados (dado não mostrado). Assim, essas três desintegrinas, nessas concentrações (ADAM9D 0,5 μM , DisBa-01 0,5 μM e Eristostatina 1 μM) foram utilizadas nos ensaios posteriores.

Como as desintegrinas podem bloquear a adesão celular através de sua ligação seletiva ao sítio de ligação das integrinas à MEC (Barja-Fidalgo e col., 2005; Selistre-de-Araujo e col., 2010), avaliamos o possível efeito “desadesivo” desses peptídeos através da contagem do número de células presentes no sobrenadante das culturas tratadas com as desintegrinas do experimento da citoquímica descrito acima. Observamos que a ADAM9D (0,5 μM) e a Eristostatina (1 μM) inibem parcialmente a adesão das células endoteliais à MEC da NGM e à gelatina, mas não à MEC da MV3 (Figura 22, painel A e C). Por outro lado, A DisBa-01 (0,5 μM) não modificou significativamente a adesão das células endoteliais sobre as matrizes (Figura 22, painel B).

Figura 21 – Marcação de F-actina das células endoteliais, pré-tratadas com desintegrinas, sobre as diferentes matrizes

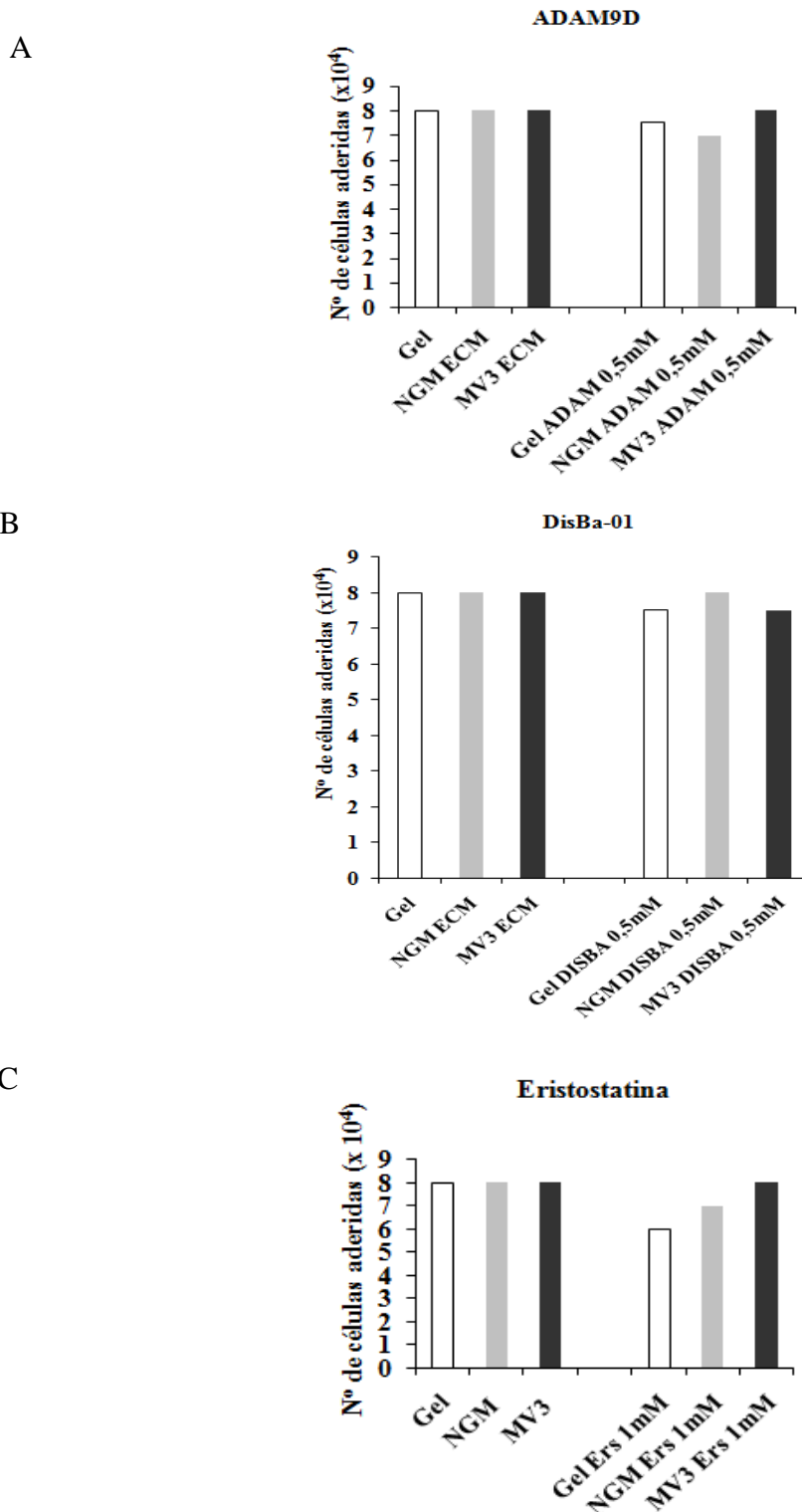






Legenda: MV3 e NGM foram semeadas por 72 horas. Após a extração da MEC, as HMEC1 (2×10^5) foram pré-tratadas por 15 minutos com as desintegrinas ADAM9D 0,5 μ M (A), DisBa-01 0,5 μ M (B) e Eristostatina 1 μ M (C) e semeadas sobre as matrizes durante 1 hora. As células foram fixadas e marcadas com faloidina conjugada a rodamina. As imagens foram capturadas em microscópio invertido em aumento de 100 vezes. As imagens são representativas de 3 experimentos independentes.

Figura 22 – Número de células endoteliais aderidas contadas no sobrenadante da citoquímica



Legenda: MV3 e NGM foram semeadas por 72 horas. Após a extração da MEC, as HMEC1 (2×10^5) foram pré-tratadas por 15 minutos com as desintegrinas ADAM9D 0,5 μ M (A), DisBa-01 0,5 μ M (B) e Eristostatina 1 μ M (C) e semeadas sobre as matrizes durante 1 hora. As células no sobrenadante foram contadas em câmara de Neubauer por exclusão de Tripan. O gráfico é representativo de 2 experimentos.

O efeito das desintegrinas sobre as alterações na dinâmica do citoesqueleto de actina foi também avaliado no pós-tratamento (de 30 minutos) de culturas de células endoteliais aderidas por 1 hora sobre a matriz da MV3 e da NGM. As HMEC1 foram tratadas com a ADAM9D (Figura 23, painel A) ou com a DisBa-01 (Figura 23, painel B) na concentração de 0,5 μM . Observamos que o pós-tratamento com ADAM9D e DisBa-01 levou a uma significativa redução na polimerização de F-actina e na formação de fibras de estresse nas células endoteliais sobre a matriz tumoral, quando comparadas com o controle. Além disso, o pós-tratamento parece não afetar a adesão das células endoteliais à MEC tumoral ou na MEC da NGM.

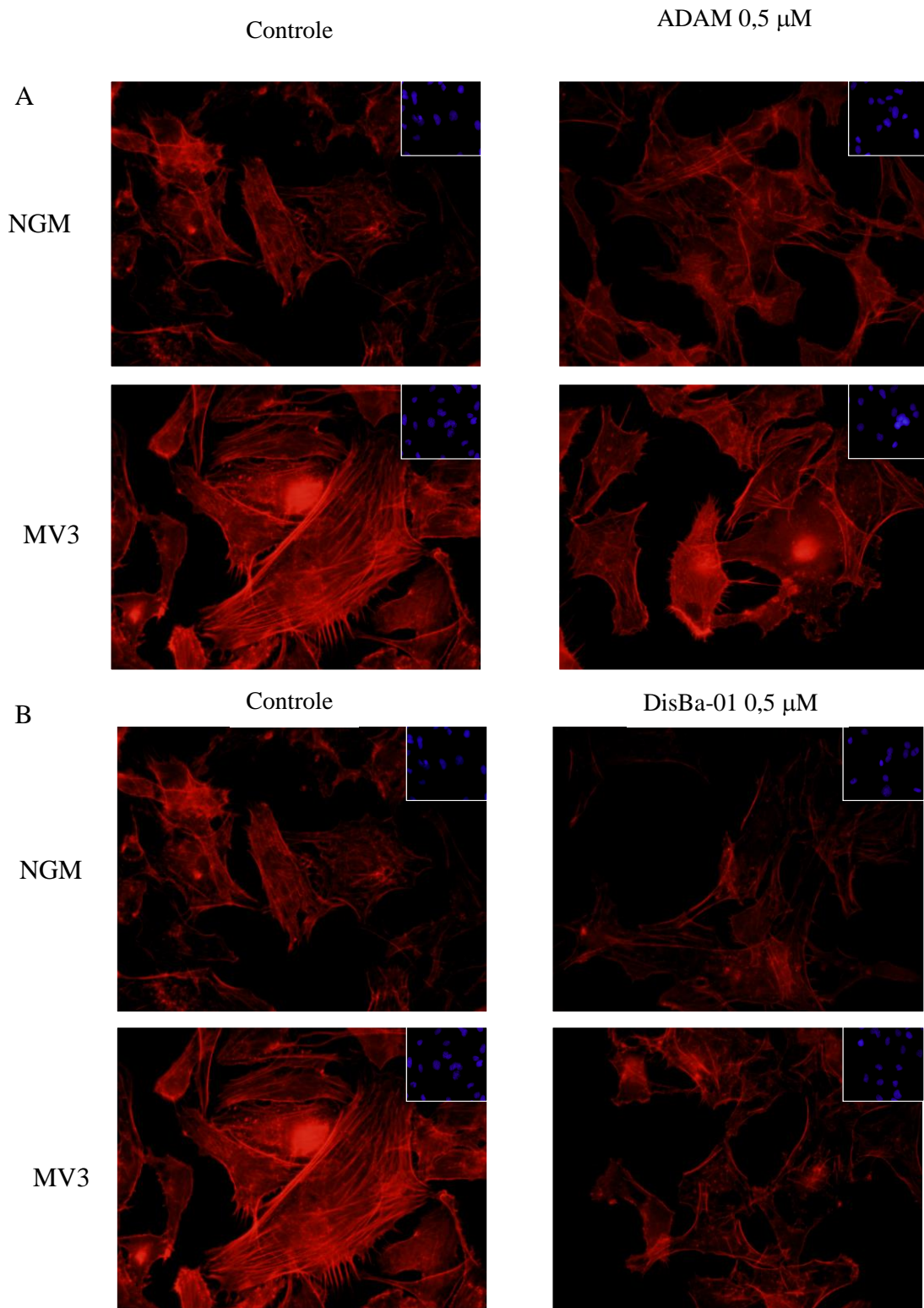
A partir destes dados, o pós-tratamento com as desintegrinas foi o método de escolha para os experimentos posteriores.

4.6 Efeito das desintegrinas sobre a migração da HMEC1 sobre as diferentes matrizes

Foi anteriormente mostrado que a desintegrina DisBa-01 apresenta um efeito anti angiogênico em modelos de plug de matrigel em camundongos nude, sendo também capaz de inibir a migração de fibroblastos e de duas linhagens tumorais *in vitro* (Ramos e col., 2008). Recentemente, demonstrou-se que o domínio desintegrina da ADAM9 inibiu a invasão de células de carcinoma mamário (MDA-MB-231) no matrigel (Cominetti e col., 2009). Além disso, a Eristostatina foi descrita como um potente inibidor da angiogênese, sendo capaz de inibir a motilidade de células de melanoma, um efeito mediado pela ligação entre integrinas e fibronectina (Tian e col., 2007).

Com o intuito de investigar o efeito da matriz tumoral sobre a capacidade migratória de células endoteliais e o papel das desintegrinas nesse efeito, realizamos o ensaio de *wound healing*, no qual as células endoteliais foram semadas sobre as matrizes da MV3, NGM e gelatina na presença ou ausência de ADAM9D (0,5 μM), DisBa-01 (0,5 μM) e Eristostatina (1 μM).

Figura 23 – Marcação de F-actina das células endoteliais, pós-tratadas com desintegrinas, sobre as diferentes matrizes

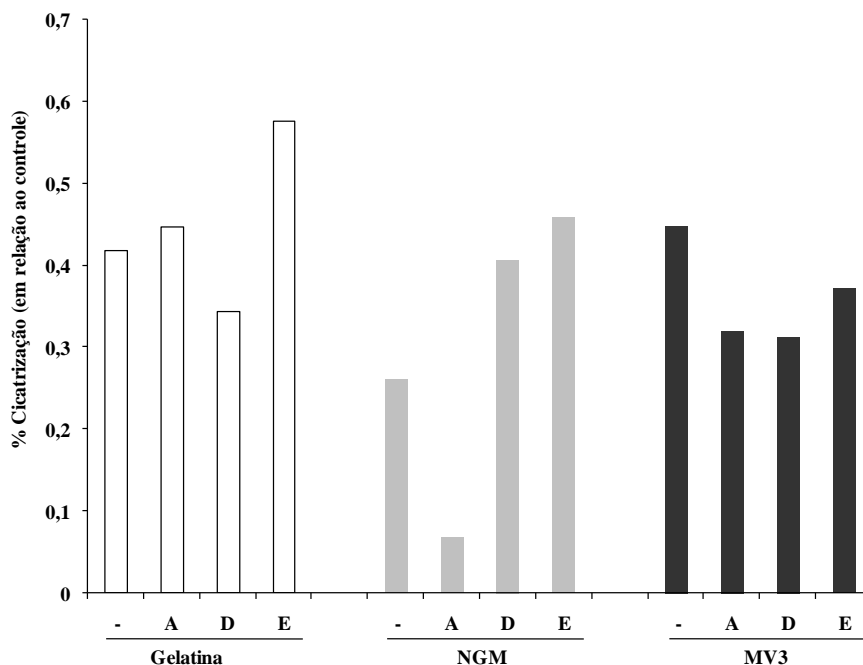


Legenda: MV3 e NGM foram semeadas por 72 horas. Após a extração da MEC, as HMEC1 (1×10^5) foram semeadas sobre as matrizes durante 1 hora e tratadas por 30 minutos com as desintegrinas ADAM9D 0,5 μ M (A) e DisBa-01 0,5 μ M (B). As células foram fixadas e marcadas com faloidina conjugada a rodamina. As imagens foram capturadas em microscópio invertido em aumento de 100 vezes. As imagens são representativas de 3 experimentos independentes.

Observamos que as células endoteliais semeadas sobre a matriz da MV3 tiveram um aumento na sua capacidade de migração ou “cicatrização” (45%), quando comparado àquelas em cultura sobre a MEC da NGM (26%) e gelatina (41%) (Figura 24, primeira barra controle). Resultados preliminares com as desintegrinas mostraram que ADAM9D, DisBa-01 e Eristostatina inibiram, parcialmente, a migração da HMEC1 sobre a matriz da MV3 (de 45% no controle para 32%, 31% e 37%, respectivamente). O tratamento com a DisBa-01 aumentou a migração sobre a matriz da NGM (de 26% para 40,6%) e diminuiu a migração sobre gelatina (de 41% para 35%). A ADAM9D não afetou a migração sobre a gelatina, mas inibiu drasticamente a migração sobre a matriz de NGM (de 26% para 7%). Por outro lado, a Eristostatina foi capaz de aumentar a migração das células endoteliais semeadas sobre gelatina (de 41% para 57%) e NGM (de 26% para 46%) (Figura 24).

Esses resultados sugerem um provável papel diferencial para cada integrina presente na superfície das células endoteliais, que deve ser mais bem investigado.

Figura 24 – Efeito das desintegrinas sobre a migração das células endoteliais sobre as diferentes matrizes



Legenda: MV3 e NGM foram semeadas por 72 horas. Após a extração da MEC, as HMEC1 (2×10^5) foram semeadas sobre as matrizes durante 3 horas, seguido de tratamento com 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de mitomicina-c. Depois, foram tratadas por 30 minutos com as desintegrinas ADAM9D 0,5 μM , DisBa-01 0,5 μM e Eristostatina 1 μM . Foram retiradas fotos, em aumento de 4 e 10 vezes no microscópio invertido nos tempos de 0 e 18 horas. A análise foi feita pelo Adobe Photoshop 5. O gráfico representa de 1 experimento.

5 DISCUSSÃO

Atualmente, as células tumorais não são mais vistas como “ilhas isoladas” dentro dos tecidos, portanto, para entender e estudar o crescimento tumoral, torna-se necessário conhecer detalhadamente o microambiente que circunda o tumor, que é constituído por diversos tipos celulares, fatores de crescimento, citocinas e componentes de matriz extracelular (Hanahan e Weinberg, 2011). No presente estudo, buscamos caracterizar e elucidar o papel de dois componentes do microambiente que circunda o melanoma humano altamente metastático: a matriz extracelular e a célula endotelial.

Existem evidências de que a matriz tumoral, remodelada por metaloproteases secretadas pelas células tumorais, apresenta componentes estruturais que podem ser explorados pelas células neoplásicas para criar um ambiente pró-tumor (Campbell e col., 2010). O contato das células endoteliais com proteínas de matriz extracelular tumoral é importante para aumentar a sobrevivência e proliferação celular, durante a angiogênese (Pilorget e col., 2007). Contudo, não existem na literatura estudos que mostrem a contribuição dessa interação nos eventos relacionados à angiogênese. Portanto, resolvemos estudar a hipótese da modulação do comportamento das células endoteliais pela MEC tumoral, facilitando a angiogênese necessária para o estabelecimento tumoral. Durante a minha monografia estudamos os efeitos da matriz tumoral nas funções das células endoteliais e durante o mestrado procuramos entender os mecanismos moleculares envolvidos na interação célula endotelial-matriz tumoral.

Para abordarmos essa questão, estabelecemos um modelo *in vitro* para obter uma matriz extracelular tridimensional produzida a partir das próprias células de melanoma (MV3) e melanócito (NGM), com o objetivo de estudar a interação dessas matrizes com as células endoteliais. Esse modelo experimental, que já foi utilizado para outros tumores (Alves e col., 2011), é interessante, uma vez que mimetiza, *in vitro*, a matriz extracelular.

Resultados preliminares do nosso grupo demonstraram que a matriz derivada do melanoma (MV3) apresenta níveis maiores de tenascina-C (8x) e laminina (18x) e menores de fibronectina (2x) em relação à matriz derivada de melanócitos (NGM) (Brandão-Costa RM, 2011). Dados da literatura mostram que a tenascina-C é uma proteína de matriz que está envolvida com o crescimento e angiogênese tumoral, facilitando a migração e a proliferação celular, enquanto a laminina é importante para os eventos de invasão tumoral e metástase, aumentando a malignidade do melanoma (Givant-Horwitz e col., 2005). Além disso, a

diminuição de fibronectina na matriz tumoral favorece a invasão tumoral, uma vez que essa proteína, em alta concentração, está mais relacionada à homeostase celular. Está bem descrito que a fibronectina está presente em membranas basais e em fluidos extracelulares, conectando tecidos e participando da adesão célula-célula e célula-matriz. Sendo assim, a fibronectina tem sido caracterizada como uma proteína de matriz pouco reativa, que estabelece interações estáveis com as células (Kim e col., 2011). Quando analisamos a distribuição dessas três proteínas nas duas matrizes estudadas, observamos diferenças na reorganização espacial. A fim de reconhecer também as diferenças estruturais mais absolutas na MEC derivada de melanoma e de melanócito, avaliamos por microscopia eletrônica de varredura essas matrizes. As imagens da matriz derivada de MV3 mostraram que esta apresentava uma característica mais fina e organizada e suas proteínas parecem se arranjar em feixes. Entretanto, a matriz da NGM apresentou uma matriz mais densa, fibrosa e menos organizada. Esse resultado poderia justificar o aumento da transmigração das células endoteliais através da MEC da MV3, comparado à MEC da NGM, visto anteriormente pelo grupo. Além disso, a forma como cada proteína se organiza em cada matriz extracelular expõe diferentes sítios de ligação, que pode ser um fator determinante para a interação com uma integrina específica, modificando as respostas celulares (Soucy e col., 2009).

Demonstramos que a matriz da MV3 era capaz de aumentar a adesão, migração, proliferação e tubulogênese das células endoteliais, comparando com o efeito da matriz da NGM (Brandão-Costa RM, 2011). Esses efeitos podem ser atribuídos às diferenças estruturais e de composição entre as duas matrizes que levariam a diferentes interações célula-matriz. Por esse motivo, começamos a investigar se a MEC da MV3 induziria uma mudança na sinalização dependente de integrinas nas HMEC1, já que essas são as principais moléculas de adesão que conectam a célula à matriz extracelular, e ainda, por serem receptores de superfície descritos por terem um papel de suma importância para a proliferação e migração das células endoteliais durante a angiogênese tumoral (Pilorget e col., 2007; Brown e col., 2008; Bolós e col., 2010). Como a ativação de FAK está intimamente ligada à ativação de integrinas e a formação de pontos de adesão focal (Schlaepfer e Mitra, 2004; Deramandt e col., 2011), analisamos o envolvimento dessa via no nosso modelo. Verificamos que a fosforilação de FAK foi significativamente maior nas células endoteliais sobre a MEC tumoral. Esse resultado nos dá indícios sobre a participação de integrinas regulando a adesão, migração, proliferação e tubulogênese das células endoteliais.

Após sua ativação pela integrina, a FAK se associa à proteínas adaptadoras do citoesqueleto que vão promover a polimerização dos microfilamentos de actina (Deramautd e col., 2011). Através do ensaio de citoquímica, demonstramos que as células endoteliais sobre a matriz tumoral aumentaram a marcação de actina filamentosa, promovendo uma reorganização em fibras de estresse, quando comparado aos efeitos induzidos pela MEC do melanócito, que apresentou um fenótipo transitório, com células que apresentavam F-actina cortical, e ainda algumas células com fibras de estresse no citoplasma. Esse resultado, junto com o aumento da fosforilação de FAK, sugere a participação de integrinas na modulação do comportamento das células endoteliais. A maior formação de fibras de estresse nas células endoteliais induzida pela interação com a MEC do melanoma caracteriza um perfil mais migratório dessa célula, contribuindo, assim, para o aumento da invasão e motilidade das células endoteliais para a formação dos novos vasos (Gaggiolli e col., 2007). Além disso, uma adesão forte à MEC, caracterizada pela organização de F-actina na borda de algumas células, como visto nas HMEC1 sobre a MEC da NGM, bloqueia o movimento celular, por aumentar a tração celular (Haass e col., 2005). Como as células endoteliais foram plaqueadas sobre matrizes com características distintas em relação à sua própria MEC, podemos esperar um aumento do “estresse celular” sobre essas duas MEC, podendo justificar as poucas células que apresentaram fibras de estresse sobre MEC da NGM, e contribuindo em parte para o aumento das fibras de estresse observadas nas HMEC1 sobre a MEC da MV3.

A fosforilação de FAK em determinados resíduos de tirosina leva à ativação de diversas vias de sinalizações intracelulares, como por exemplo, a via da PI3K/AKT que regula a sobrevivência e a migração celular (Cantley, 2002; Liu e col., 2009). Esta via está frequentemente exarcebada no câncer, aumentando a possibilidade de invasão e metástase (Martini e col., 2013). Já havíamos visto que a célula endotelial migrava mais através da MEC derivada do melanoma, e que essa migração durava 6 horas (Brandão-Costa RM, 2011), portanto, avaliamos se as células endoteliais apresentavam também um aumento da fosforilação de AKT. Corroborando com o resultado descrito, observamos um aumento significativo na fosforilação de AKT nas células HMEC1 plaqueadas durante 1 e 6 horas sobre a matriz de MV3.

Em resultados prévios, demonstramos que as células endoteliais que ficaram em contato por 24 horas com a matriz tumoral aumentaram a tubulogênese no matrigel, comparado ao efeito da MEC da NGM (Brandão-Costa RM, 2011). A angiogênese tumoral é, em parte, regulada pela ligação do VEGF ao VEGFR2 (Karamysheva, 2008). Assim,

investigamos se o contato com a MEC da MV3 poderia induzir um aumento da expressão de receptores de VEGF nas células endoteliais. Não observamos diferenças significativas na expressão de mRNA do VEGFR1 e VEGFR2 nas células endoteliais sobre as duas matrizes. Este resultado sugere que o aumento da tubulogênese observado era devido à informação fornecida pela MEC tumoral através da ativação de diferentes integinas, e não pela indução do aumento da expressão do receptor do VEGF nas células endoteliais.

Apesar de não observamos nenhuma diferença nos níveis de expressão do RNAm de VEGFR2 e VEGFR1, não descartamos a possibilidade de uma regulação pós-traducional ou mesmo de um aumento da sensibilidade do VEGFR2 ao seu ligante, o VEGF. Portanto, investigamos se a matriz extracelular poderia aumentar a fosforilação do VEGFR2 após a interação com VEGF. Observamos que o contato das células endoteliais durante 24 horas com MEC tumoral aumentou a fosforilação do VEGFR2 nessas células, comparado às células sobre a MEC da NGM. Nesse experimento, as células endoteliais receberam igualmente uma concentração subótima de VEGF, para que pudéssemos observar a sensibilidade do receptor. Esse resultado sugere que o contato da célula endotelial com a matriz tumoral pode ser importante para ativar a integrina que, por sua vez, aumentou a sensibilidade do VEGFR2 ao VEGF, levando à tubulogênese das células endoteliais. Dados recentes da literatura têm mostrado a importância da transativação entre receptores de VEGF e integinas, nas células endoteliais, podendo favorecer o crescimento tumoral, intensificando o processo de angiogênese (Eliceiri, 2001). Recentemente, um estudo mostrou que o bloqueio da integrina $\alpha\beta3$, pela desintegrina DisBa-01, era capaz de impedir a sinalização do VEGF, nas células endoteliais (Montenegro e col., 2012).

Vários estudos mostram que Src parece regular a transativação entre integrina e VEGFR em células vasculares (Basson, 2008; Somanath e col., 2009). Alguns estudos mostraram que a interação entre c-Src e VEGFR induz a migração celular e a tubulogênese das células vasculares (Guarino e col., 2010; Galvagni e col., 2010). Quando há a ligação da integrina à matriz extracelular, a autofosforilação da FAK no resíduo de Tyr³⁹⁷ permite a associação de outras quinases através de seus domínios SH2 (Mitra e col., 2005; Legate e col., 2009). A associação com a Src também leva à ativação de FAK, dessa forma Src também pode modular a ativação da própria FAK, que será fosforilada em outros resíduos, ativando outras vias de sinalização associadas à integrina e a outros receptores (Schlaepfer e col., 1994; Legate e col., 2009). A associação FAK-Src já foi evidenciada na morfogênese (Eliceiri, 2001) e no câncer (Bolós e col., 2010; Guarino, 2010). A Src por sua vez também tem sido

identificada como um dos elos na ativação cruzada entre as integrinas e receptores de fatores de crescimento (Somanath e col., 2009). Dessa forma, investigamos a associação de c-Src à FAK, nas células endoteliais, e detectamos que a MEC tumoral induz um aumento na associação de c-Src-FAK. Esses resultados sugerem que a ativação de c-Src poderia estar mediando a sinalização entre a integrina e o VEGFR2. Para confirmar esta hipótese, estamos no momento investigando se inibidores da ativação da Src poderiam bloquear o aumento da sensibilização do VEGFR ao VEGF induzido pela adesão à matriz tumoral.

Nesse trabalho, observamos ainda o efeito de desintegrinas sobre a interação, via integrina, entre a matriz tumoral e a célula endotelial. As desintegrinas se ligam seletivamente às integrinas, exercendo um bloqueio estérico da ligação da integrina à matriz, e, também modificando suas funções (Barja-Fidalgo e col., 2005). Nosso grupo vem demonstrando que desintegrinas isoladas do veneno de serpentes interagem com as integrinas expressas em neutrófilos, linfócitos e células de melanoma murino, modulando diferentes funções celulares (Neto e col., 2007; Oliva e col., 2007; Saldanha-Gama e col., 2010). Neste trabalho avaliamos, primeiramente, o efeito das desintegrinas sobre a polimerização do citoesqueleto de actina das células endoteliais induzida pela matriz tumoral. Para tanto, pré-tratamos as células endoteliais com as desintegrinas ADAM9D (ligante de $\alpha6\beta1$, $\alpha3\beta1$, $\alpha v\beta3$), DisBa-01 (ligante de $\alpha v\beta3$), Eristostatina (ligante de $\alpha4\beta1$, $\alpha v\beta3$), Alternagina-C (ligante de $\alpha v\beta3$, $\alpha2\beta1$), Kistrina (ligante de $\alpha v\beta3$) e Flavoridina (ligante de $\alpha5\beta1$). Apenas a ADAM9D a 0,5 μM , DisBa-01 a 0,5 μM e Eristostatina a 1 μM diminuíram a polimerização de actina e a formação de fibras de estresse nas células endoteliais que foram semeadas sobre a MEC da MV3. Além disso, a ADAM9D e a Eristostatina aumentaram a adesão das células endoteliais à MEC da MV3, enquanto a DisBa-01 não afetou significativamente a adesão da HMEC1 em nenhuma das matrizes. Esses resultados sugerem que as integrinas $\alpha6\beta1$, $\alpha v\beta3$, $\alpha3\beta1$ e $\alpha4\beta1$ estariam participando dos eventos estudados (adesão, migração, proliferação e tubulogênese) que estão relacionados com o processo angiogênico, uma vez que as desintegrinas ADAM9D, DisBa-01 e Eristostatina, que se ligam preferencialmente a essas integrinas, foram capazes de modificar a resposta gerada pelo contato da célula endotelial com a matriz tumoral. As outras desintegrinas testadas se ligam à integrinas, como $\alpha2\beta1$ e $\alpha5\beta1$, que, provavelmente, não possuem um papel relevante na interação da célula endotelial com a matriz extracelular do melanoma.

As desintegrinas, por se ligarem às integrinas, podem ser utilizadas como protótipo para o desenho de fármacos para novas terapias anti tumorais, cuja característica seria o

bloqueio da adesão celular e da angiogênese tumoral (Selistre-de-Araujo e col., 2010). Pensando na utilização de desintegrinas como fármacos capazes de reverter o efeito da matriz tumoral sobre as células endoteliais, pós-tratamos as células endoteliais com as desintegrinas ADAM9D e DisBa-01 a 0,5 μM , e vimos a redução da polimerização de F-actina e a formação de fibras de estresse nas células endoteliais semeadas sobre a matriz tumoral, revelando uma possível ferramenta contra a angiogênese tumoral.

As desintegrinas também já foram descritas como inibidoras da migração mediada por integrina (Saldanha-Gama e col., 2010; Selistre-de-Araujo e col., 2010). Já foi descrito que DisBa-01 inibe a migração de fibroblastos e células tumorais *in vitro* (Ramos e col., 2008), que o domínio desintegrina da ADAM9 foi capaz de inibir a invasão no matrigel das células MDA-MB-231 (Cominetti e col., 2009), e que a Eristostatina foi capaz de inibir a motilidade da célula tumoral do melanoma, um efeito mediado pela ligação entre integrinas e fibronectina (Tian e col., 2007). Portanto, avaliamos a migração das células endoteliais sobre a matriz tumoral na presença de ADAM9D, DisBa-01 e Eristostatina. As três desintegrinas utilizadas diminuíram a migração das células endoteliais sobre a matriz da MV3, em comparação com o grupo não tratado, reforçando a idéia que a interação de diferentes integrinas com a MEC modula diferencialmente as células endoteliais no microambiente tumoral.

Cada integrina é capaz de se ligar seletivamente a diferentes proteínas de matriz, ativando diferentes vias de sinalização, que modificam o comportamento celular. Essa seletividade é determinada pelo domínio extracelular das integrinas (Guan, 2010). De modo interessante, as integrinas que não estariam participando da interação célula-matriz ($\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$) se ligam à colágeno e fibronectina na MEC, que não tiveram sua expressão aumentada na MEC do melanoma, quando comparada à do melanócito. Por outro lado, as integrinas que estariam participando dos eventos estudados ($\alpha 6\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 4\beta 1$) se ligam seletivamente às proteínas de matriz fibronectina, vitronectina e laminina. Dentre essas, a laminina foi a proteína de MEC que mais aumentou na matriz do melanoma, quando comparada à matriz do melanócito. Estudos mostram que a interação da laminina com a célula tumoral regula eventos como invasão tumoral e metástase (Engbring e Kleinman, 2003), além de estar envolvida no processo de angiogênese e na regulação da adesão e migração dos melanócitos e melanoma (Chung e col., 2010). Por esse motivo o uso de moléculas que impeçam essa interação, como as desintegrinas, pode contribuir para a diminuição da agressividade do melanoma.

Resumidamente, a ligação das integrinas da célula endotelial a componentes de matriz extracelular tumoral (destacando laminina e tenascina-C que estão mais expressas na matriz do melanoma) induz o recrutamento e ativação de FAK que além de modificar a organização do citoesqueleto de actina da HMEC1, também é capaz de ativar outras vias de sinalização intracelulares dependentes de integrina, como a via da PI3K/AKT, que levam ao aumento da migração, proliferação e adesão celular. A FAK ativada também pode se associar e ativar a c-Src que fosforila o receptor do VEGF, aumentando a sensibilidade desse receptor ao VEGF presente no microambiente tumoral, levando ao aumento da tubulogênese.

Sugerimos, dessa forma, que as integrinas, que conectam a célula endotelial à MEC tumoral, têm um papel fundamental em todos os eventos celulares estudados, principalmente as integrinas as quais as desintegrinas estudadas se ligam: $\alpha6\beta1$, $\alpha\nu\beta3$, $\alpha3\beta1$ e $\alpha4\beta1$, destacando-se a integrina $\alpha\nu\beta3$, já que é a integrina-alvo em comum entre as três desintegrinas, além de existirem na literatura fortes indícios de que essa integrina, presente na superfície de células endoteliais, é capaz de transativar com o VEGFR2, modificando a sinalização e aumentando a angiogênese (Ramos e col., 2007; Montenegro e col., 2012).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o presente momento mostram que a matriz extracelular tumoral é capaz de modificar vias de sinalização dependentes de integrinas em células endoteliais. A ativação de integrinas leva à ativação de FAK, que modifica a organização do citoesqueleto de actina. A ativação de FAK também pode levar à ativação da via PI3K/AKT levando ao aumento da migração das células endoteliais, e à ativação de c-Src que fosforila o VEGFR2, aumentando a sua sensibilidade ao VEGF, promovendo a tubulogênese das células endoteliais. Portanto, nossos dados sugerem a existência de um fenômeno de transativação entre as integrinas e o receptor 2 do VEGF, importante para reforçar os eventos celulares relacionados à angiogênese.

Por fim, as desintegrinas ADAM9D, DisBa-01 e Eristostatina parecem ser capazes de modificar o efeito da matriz tumoral sobre a organização de F-actina e a migração das células endoteliais sobre a matriz tumoral, ressaltando a participação de integrinas as quais as desintegrinas citadas se ligam: $\alpha6\beta1$, $\alpha v\beta3$, $\alpha3\beta1$ e $\alpha4\beta1$.

REFERÊNCIAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. 5. ed. Brasil: Artmed; 2010.

Allen M, Louise JJ. Jekyll and Hyde: The role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol*. 2011 Jan;223(2):162-76

Alves TR, da Fonseca AC, Nunes SS, da Silva AO, Dubois LG. *et al*. Tenascin-C in the extracellular matrix promotes the selection of highly proliferative and tubulogenesis-defective endothelial cells. *Experimental Cell Res*. 2011 Sep 10;317(15):2073-85.

Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008 Nov; 8(8): 604-17.

Baker KA, Hagg T. Developmental and injury-induced expression of alpha1beta1 and alpha6beta1 integrins in the rat spinal cord. *Brain Research*. 2007 Jan 26; 1130(1):54-66.

Barcellos-de-Souza P, Moraes JA, de-Freitas-Junior JC, Morgado-Díaz JA, Barja-Fidalgo C, Arruda MA. Heme modulates intestinal epithelial cell activation: involvement of NADPHox-derived ROS signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013 Jan 15; 304(2):C170-79.

Barja-Fidalgo C, Coelho AL, Saldanha-Gama R, Helal-Neto E, Mariano-Oliveira A, Freitas MS. Disintegrins: integrin selective ligands which activate integrin-coupled signaling and modulate leukocyte functions. *Braz J Med Biol Res*. 2005 Oct;38(10):1513-20.

Barkan D, Green JE, Chambers AF. Extracellular matrix: A gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. *Eur J Cancer*. 2010 May; 46(7):1181-88.

Basson MD. An intracellular signal pathway that regulates cancer cell adhesion in response to extracellular forces. *Cancer Res*. 2008 Jan 1;68(1):2-4.

Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K. *et al*. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000 Oct;2(10):737-44.

Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, Kerbel RS. The multifaced circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer*. 2006 Oct; 6(11): 835-45.

Beviglia L, Stewart GJ, Niewiarowski S. Effect of four disintegrins on the adhesive and metastatic properties of B16F10 melanoma cells in a murine model. *Oncol. Res*.1995 ;7(1):7-20.

Black RA, White JM. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol*. 1998 Oct; 10(5):654-9

Bolós V, Gasent JM, López-Tarruella S, Grande E. The dual kinase complex FAK-*Src* as a promising therapeutic target in cancer. *Onco Targets Ther*. 2010 Jun 24;3:83-97.

Bonnefoy A, Legrand C. Proteolysis of subendothelial adhesive glycoproteins (fibronectin, thrombospondin, and von Willebrand factor) by plasmin, leukocyte cathepsin G, and elastase. *Thromb Res* 2000 May 15;98(4):323-32.

Borges E, Jan Y, Ruoslahti E. Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain. *J Biol Chem* 2000 Dec 22;275(51):39867-73.

Bourdon MA, Wikstrand CJ, Furthmayr H, Matthews TJ, Bigner DD. Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody. *Cancer Res.*1983 Jun;43(6):2796-805.

Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T, Fassles R. Integrins in invasive growth. *J Clin Invest.* 2002 Apr;109(8):999-1006.

Brandão-Costa RM. Efeitos da matriz de melanoma humano no comportamento da célula endotelial humana, durante a angiogênese tumoral [Monografia]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2011.

Brown MC, Staniszewska I, Del Valle L, Tuszynski GP, Marcinkiewicz C. Angiostatic activity of obtustatin as alpha1beta1 integrin inhibitor in experimental melanoma growth. *Int. J. Cancer.* 2008 Nov 1; 123(9): 2195-203.

Brunton VG, Avizienyte E, Fincham VJ, Serrels B, Metcalf CA, Sawyer TK, *et al.* Identification of Src-specific phosphorylation site on focal adhesion kinase: dissection of the role of Src SH2 and catalytic functions and their consequences for tumor cell behavior. *Cancer Res.* 2005 Feb 15; 65(4):1335-42.

Calvete JJ, Marcinkiewicz C, Monleón D, Esteve V, Celda B, Juárez P, *et al.* Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon.* 2005 Jun 15; 45(8):1063-74.

Calvete JJ, Domont GB, Padron G. Meeting report MPSA. *J. Proteomics.* 2008 Apr 30;71(1):4-10.

Calvete JJ. The continuing saga of snake venom disintegrins. *Toxicon.* 2013 Feb;62:40-9.

Campbell NE, Kellenberger L, Greenaway J, Moorehead RA, Linnerth-Petrik NM. *et al.* Extracellular matrix proteins and tumor angiogenesis. *Journal of Oncology.* 2010 Jun 29; 53(5); 586-96.

Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 2002 May 31; 296(5573):1655-7.

Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, Roessner A, Röcken C. The disintegrin-metalloproteinases ADAM9, ADAM12, and ADAM15 are upregulated in gastric cancer. *Int J Oncol.* 2005 Jan; 26(1):17-24.

Chandrasekaran L, He CZ, Al-Barazi H, Krutzsch HC, Iruela-Arispe ML, Roberts DD. Cell contact-dependent activation of alpha3beta1 integrin modulates endothelial cell responses to thrombospondin-1. *Mol. Biol. Cell.* 2000 Sep;11(9):2885-900.

Chin L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jan; 3(8): 559-70.

Chung CY, Murphy-Ullrich JE, Erickson HP. Mitogenesis, cell migration, and loss of focal adhesions induced by tenascin-C interacting with its cell surface receptor, annexin II. *Mol. Biol. Cell*. 1996 Jun;7(6):883-92.

Coelho AL, De Freitas MS, Mariano-Oliveira A, Rapozo D.C, Pinto L.F, Niewiarowski, S. RGD- and MLD-disintegrins, jarastatin and EC3, activate integrin-mediated signaling modulating the human neutrophils chemotaxis, apoptosis and IL-8 gene expression. *Exp. Cell Res*. 2004 Jan 15; 292(2):371-84.

Collet GD, Canfield AE. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circ Res*. 2005 Sep; 96(9): 930-38.

Cominetti MR, Martin ACBM, Ribeiro JU, Djaafri I, Fauvel-Lafève F, Crépin M. *et al*. Inhibition of platelets and tumor cell adhesion by the disintegrin domain of human ADAM9 to collagen I under dynamic flow conditions. *Biochimie*. 2009 Jun 28; 91(9) 1045-52.

Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J*. 2007 Apr;21(4):976-94.

Cox TR, Erler JT. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: Implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech*. 2011 Mar;4(2):165-78.

Danen EH, Marcinkiewicz C, Cornelissen IM, van Kraats AA, Pachter JA, Ruiters DJ. *et al*. The disintegrin eristostatin with integrin alpha4 beta 1 function and with experimental metastasis of human melanoma cells. *Exp Cell Res*. 1998 Jan 10;238(1):188-96.

Davis GE, Senger DR. Endothelial Extracellular Matrix Biosynthesis, Remodeling, and Functions During Vascular Morphogenesis and Neovessel Stabilization. *Circulation Research*. 2005 Nov 25;97(11):1093-107.

Deramandt TB, Dujardin D, Hamadi A, Noulet F, Kolli K, De Mey J. *et al*. FAK phosphorylation at Tyr-925 regulates cross-talk between focal adhesion turnover and cell protrusion. *Molecular Biology of the Cell*. 2011 Apr; 22(7): 964-75.

Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*. 2002 Nov 1;20(21):4368-80.

Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell* 2010 Jun 15;18(6):884-901.

Eide MJ, Weinstock MA. Association of UV index, latitude, and melanoma incidence in nonwhite populations—US Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program, 1992 to 2001. *Arch Dermatol*. 2005. Jun; 141(4): 477-81.

- El-Bacha T, de Freitas MS, Sola-Penna M. Cellular distribution of phosphofructokinase activity and implications to metabolic regulation in human breast cancer. *Mol Genet Metab.* Dec; 79(4): 294-99.
- Eliceiri BP. Integrin and Growth Factor Receptor Crosstalk. *Circ Res.* 2001 Dec 7; 89(12): 1104-10.
- Emmett MS, Dewing D, Pritchard-Jones RO. Angiogenesis and melanoma-from basic science to clinical trials. 2011 Nov; 1(7):852-68.
- Engbring JA, Kleinman HK. The basement membrane matrix in malignancy. *J. Pathol.* 2003 Jul;200(4):465-70.
- Ferguson J, Arozarena I, Ehrhardt M, Wellbrock C. Combination of MEK and SRC inhibition suppresses melanoma cell growth and invasion. *Oncogene.* 2013 Jan 3;32(1):86-96.
- Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001 Jun;280(6):C1358-66.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004 Aug; 25(4):581-611.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its Receptors *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):669-76.
- Ferrari do Outeiro-Bernstein MA; Nunes SS; Andrade AC; Alves TR; Legrand C; Morandi V. A recombinant NH₂-terminal heparin-binding domain of the adhesive glycoprotein, thrombospondin-1, promotes endothelial tube formation and cell survival: a possible role for syndecan-4 proteoglycan. *Matrix Biology.* 2002 Jun;21(4):311-24.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971 Nov 18;285(21):1182-6.
- Folkman J. Endogenous angiogenesis inhibitors. *APMIS.* 2004 Jul-Aug;112(7-8):496-507.
- Franses JW, Baker AB, Chitalia VC, Edelman ER. Stromal endothelial cells directly influence cancer progression. *Sci Transl Med.* 2011 Jan 19;3(66):66ra5.
- Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol.* 1994 Feb;124(4):619-26.
- Fritzsche FR, Wassermann K, Jung M, Tölle A, Kristiansen I, Lein M, *et al.* ADAM9 is highly expressed in renal cell cancer and is associated with tumour progression. *BMC Cancer.* 2008 Jun 26; 8:179.
- Gaggioli C, Sahai E. Melanoma invasion-Current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res.* 2007 Jun; 20(3): 161-72.

- Galvagni F, Pennacchini S, Salameh A, Rocchigiani M, Neri F, Orlandini M. *et al.* Activity VEGFR-3 Phosphorylation Without the Activation of the Receptor Intrinsic Kinase Endothelial Cell Adhesion to the Extracellular Matrix Induces c-Src-Dependent. *Circ Res.* 2010 Jun 25;106(12):1839-48.
- Garcia SF, Cella D, Clauser SB, Flynn KE, Lad T, Lai JS, *et al.* Standardizing patient-reported outcomes assessment in cancer clinical trials: a patient-reported outcomes measurement information system initiative. *J Clin Oncol.* 2007 Nov 25(32): 5106-12.
- Garland CF, Garland FC, Gorham ED. Rising trends in melanoma. An hypothesis concerning sunscreen effectiveness. *Ann Epidemiol.* 1993 Nov; 3(1): 103-10.
- Geho DH, Bandle RW, Clair T, Liotta LA. Physiological mechanisms of tumor-cell invasion and migration. *Physiology (Bethesda).* 2005 Dec; 20: 194-200.
- Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.* 2003 Oct;314(1):15-23.
- Giancotti FG, Rouslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999 Aug 13;285(5430):1028-32.
- Giancotti FG, Tarone G. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003; 19:173-206.
- Gille J. Antiangiogenic cancer therapies get their act together: current developments and future prospects of growth factor- and growth factor receptor-targeted approaches. *Exp Dermatol* 2006 Mar;15(3):175-86.
- Givant-Horwitz V, Davidson B, Reich R. Laminin-induced signaling in tumor cells. *Cancer Letters.* 2005 Jun 1; 223(1): 1-10.
- Greenaway J, Lawler J, Moorehead R, Bornstein P, Lamarre J, Petrik J. Thrombospondin-1 inhibits VEGF levels in the ovary directly by binding and internalization via the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1). *J Cell Physiol* 2007 Mar; 210(3): 80718.
- Guan JL. Integrin signaling through FAK in the regulation of mammary stem cells and breast cancer. *IUBMB Life.* 2010 Apr; 62(4): 268-76.
- Guarino M. Src Signaling in Cancer Invasion. *J. Cell Physiol.* 2010 Nov 3; 223 (5): 14–26.
- Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Oct; 5(10):816-26.
- Haass NK, Smalley KS, Li L, Herlyn M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* 2005. Jul; 18 (3): 150-59.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011 Mar 4; 144(5):646-74.

Harmey JH and Bouchier-Hayes D. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: implications for antiangiogenic therapy. *Bioessays* 2002 Mar;24(3):280-83.

Heck DE, Shakarjian M, Kim HD, Laskin JD, Vetrano AM. Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Nov; 1203: 120-25.

Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Aug 4;95(16):9349-54.

Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. Molecular plasticity of human melanoma cells. *Oncogene.* 2003 Nov; 22(20): 3070-75.

Hielscher AC, Gerecht S. Engineering approaches for investigating tumor angiogenesis: exploiting the role of the extracellular matrix. *Cancer Res.* 2012 Dec 1; 72(23): 6089-96.

Horimoto Y, Polanska UM, Takahashi Y, Orimo A. Emerging roles of the tumor-associated stroma in promoting tumor metastasis. *Cell Adh Migr.* 2012 Jun;6(3):193-202.

Hsu MY, Meier F, Herlyn M. Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation.* 2002 Nov; 70(9-10): 522-36.

Huang TF, Holt JC, Lukasiewicz H, Niewiarowski S. Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb/IIIa complex. *J. Biol. Chem.* 1987 Nov 25;262(33):16157-63.

Huttenlocher A, Horwitz AR. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Sep 1;3(9):a005074.

Hynes RO. Cell-matrix adhesion in vascular development. *J Thrombosis and haemostasis.* 2007 Jul;5 Suppl 1:32-40.

Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002 Sep 20; 110(6):673-87.

Instituto Nacional do Câncer. Tipos de câncer: Pele melanoma [Internet]. Rio de Janeiro; 2013 [acesso em 2014 fevereiro 05]. Disponível em: www2.inca.gov.br

Ilić D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N. *et al.* Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 1995 Oct 12;377(6549):539-44.

Jain RK. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. *J Clin Oncol.* 2013 Jun 10;31(17):2205-18.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2007 Dec; 57(1): 43-66.

- Joshi P, Chung CY, Aukhil I, Erickson HP. Endothelial cells adhere to the RGD domain and the fibrinogen-like terminal knob of tenascin. *J. Cell Sci.* 1993 Sep;106 (Pt 1):389-400.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 11. ed. Brasil: Guanabara Koogan; 2008.
- Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry.* 2008 Nov; 73(7): 751-62.
- Kauskot A, Cominetti MR, Ramos OH, Bechyne I, Renard JM, Hoylaerts MF. *et al.* Hemostatic effects of recombinant DisBa-01, a disintegrin from *Bothrops alternatus*, *Front. Biosci.* 2008 May 1;13:6604-16.
- Kennedy KA, Teicher BA, Rockwell S, Sartorelli AC. The hypoxic tumor cell: a target for selective cancer chemotherapy. *Biochem Pharmacol.* 1980 Jan 1;29(1):1-8.
- Kenny PA, Lee GY, Bissell MJ. Targeting the tumor microenvironment. *Front Biosci.* 2007 May 1;12:3468-74.
- Kim S, Myung WC, Lee JS, Cha JK, Jung UW, Yang HC. *et al.* The effect of fibronectin-coated implant on canine osseointegration. *J. Periodontal Implant Sci.* 2011 Nov; 41(5): 242-47.
- Koch S, Tugus S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. *Biochem J.* Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. 2011 Jul 15; 437(2):169-83.
- Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff AK. Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer and Metastasis Reviews.* 2005 Jun;24(2):195-222.
- Kurschat P, Mauch C. Mechanisms of metastasis. *Clin Exp Dermatol.* 2000 May; 25(6): 482-89.
- Lasithiotakis KG, Petrakis IE, Garbe C. Cutaneous melanoma in the elderly: epidemiology, prognosis and treatment. *2010 Melanoma Res Nov; 20(3): 163-70.*
- Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, Carpizo D, Iruela-Arispe ML. Processing of VEGFA by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol* 2005 May 23;169(4):681-91.
- Legate KR, Wickström SA, Fässler R. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev.* 2009 Feb 15;23(4):397-418.
- Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(1):62-70.
- Li L, Liu F, Welser-Alves JV, McCullough LD, Milner R. Upregulation of fibronectin and the $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins on blood vessels within the cerebral ischemic penumbra. *Exp Neurol.* 2012 Jan;233(1):283-91.
- Li X, Ma Q, Xu Q, Duan W, Lei J, Wu E. Targeting the Cancer-Stroma Interaction: A Potential Approach for Pancreatic Cancer Treatment. *Curr Pharm Des.* 2012;18(17):2404-15.

- Liddington RC, Ginsberg MH. Integrin activation takes shape. *J Cell Biol.* 2002 Sep 2;158(5):833-9.
- Lim ST, Chen XL, Lim Y, Hanson DA, Vo TT, Howerton K. *et al.* Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Mol Cell.* 2008 Jan 18;29(1):9-22.
- Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature.* 2007. Nov; 445(7130): 843-50.
- Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest.* 2007 May;117(5):1175-83.
- Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2009 Aug;8(8):627-44.
- Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH. Integrin cytoplasmic-domain binding proteins. *J Cell Sci.* 2000 Oct; 113 (Pt 20):3563-71.
- Llera AS; Girotti MR; Benedetti LG; Podhajcer OL. Matricellular proteins and inflammatory cells: A task force to promote or defeat cancer?. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2010 Feb;21(1):67-76.
- Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol.* 2012 Feb 20;196(4):395-406.
- Mahabeleshwar GH, Byzova TV. Angiogenesis in Melanoma. *Semin. Oncol.* 2007 Nov; 34(6):555-65.
- Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol. Rev.* 2003 Nov; 83(2): 337-76.
- Marastoni S, Ligresti G, Lorenzon E, Colombatti A, Mongiat M. Extracellular matrix: A matter of life and death. *Connective Tissue Research.* 2008 Sep; 49(3):203-06.
- Marcinkiewicz C. Functional Characteristic of Snake Venom Disintegrins: Potential Therapeutic Implication. *Curr Pharm Des.* 2005 11(7):815-27.
- Marelli UK, Rechenmacher F, Sobahi TR, Mas-Moruno C, Kessler H. Tumor targeting via integrin ligands. *Front Oncol.* 2013 Aug 30;3:222.
- Marshall JF, Rutherford DC, Happerfield L, Hanby A, McCartney AC, Newton-Bishop J, *et al.* Comparative analysis of integrins in vitro and in vivo in uveal and cutaneous melanomas. *Br. J. Cancer.* 1998 Feb;77(4):522-9.
- Martín de Civetta MT, Civetta JD. Carcinogenesis. *Salud Publica Mex.* 2011 Sep-Oct;53(5):405-14.

Martini M, Ciruolo E, Gulluni F, Hirsch E. Targeting PI3K in cancer: any good news? *Frontiers in oncology*. 2013 May 8; 108(3): 1-9.

Mazzocca A, Coppari R, De Franco R, Cho JY, Libermann TA, Pinzani M, *et al.* A secreted form of ADAM9 promotes carcinoma invasion through tumor-stromal interactions. *Cancer Res*. 2005 Jun 1; 65(11):4728-38.

McLane MA, Vijay-Kumar S, Marcinkiewicz C, Calvete JJ, Niewiarowski S. Importance of the structure of the RGD-containing loop in the disintegrins echistatin and eristostatin for recognition of alpha IIb beta 3 and alpha v beta 3 integrins. *FEBS Letters*. 1996 Aug 5;391(1-2):139-43.

McLane MA, Marcinkiewicz C, Vijay-Kumar S, Wierzbicka-Patynowski I, Niewiarowski S. Viper venom disintegrins and related molecules. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1998 Nov;219(2):109-19.

Mettouchi A. The role of extracellular matrix in vascular branching morphogenesis. *Cell Adh Migr*. 2012 Nov-Dec;6(6):528-34.

Mierk CT, Frey B, Fellner M, Herrmann M, Fabry B. Integrin alpha5beta1 facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces. *J Cell Sci*. 2011 Feb 1;124(Pt 3):369-83.

Mierke CT. Endothelial cell's biomechanical properties are regulated by invasive cancer cells. *Mol Biosyst*. 2012 Jun;8(6):1639-49.

Midlej V, Meinig I, de Souza W, Benchimol M. A New Set of Carbohydrate-positive Vesicles in Encysting *Giardia lamblia*. *Protist*. 2012 Mar; 164(2):261-71.

Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: In command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2005 Jan;6(1):56-68.

Montenegro CF, Salla-Pontes CL, Ribeiro JU, Machado AZ, Ramos RF, Figueiredo CC. *et al.* Blocking $\alpha v \beta 3$ integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. *Biochimie*. 2012 Apr 19; 94(12): 1812-20.

Morandi V, Cherradi SE, Lambert S, Fauvel-Lafève F, Legrand YJ, Legrand C. Proinflammatory cytokines (interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha) down regulate synthesis and secretion of thrombospondin by human endothelial cells. *J. Cell. Physiol*. 1994 Aug;160(2):367-77.

Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes-Bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004 Nov 1; 4(11):839-49.

Morris VL, Schmidt EE, Koop S, MacDonald IC, Grattan M, Khokha R. *et al.* Effects of the disintegrin eristostatin on individual steps of hematogenous metastasis. *Exp. Cell Res*. 1995 Aug;219(2):571-8.

Nascimento-Silva V, Arruda M.A, Barja-Fidalgo C, Fierro I.M. Aspirin-triggered lipoxin A4 blocks reactive oxygen species generation in endothelial cells: a novel antioxidative mechanism. *Thromb. Haemost.* 2007 Jan; 97(1):88-98.

Nasulewicz-Goldeman A, Uszczyńska B, Szczauńska-Nowak K, Wietrzyk J. siRNA-mediated silencing of integrin $\beta 3$ expression inhibits the metastatic potential of B16 melanoma cells. *Oncol Rep.* 2012 Nov;28(5):1567-73.

Neto EH, Coelho AL, Sampaio AL, Henriques Md, Marcinkiewicz C, De Freitas MS. *et al.* Activation of human T lymphocytes via integrin signaling induced by RGD-disintegrins. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Feb;1773(2):176-84.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 1999 Jan;13(1):9-22.

Nizet V, Johnson RS. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009 Sep;9(9):609-17.

Okuyama H, Inoue M. Hypoxic microenvironment and cancer dormancy. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2011 Oct;38(10):1559-64.

Oliva IB, Coelho RM, Barcellos GG, Saldanha-Gama RF, Wermelinger LS, Marcinkiewicz C. *et al.* Effect of RGD-disintegrins on melanoma cell growth and metastasis: involvement of the actin cytoskeleton, FAK and c-Fos. *Toxicol.* 2007 Dec 5; 50(8):1053-63.

Ordman AB, Cleaveland JS, Boutwell RK. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate promotes tumors prior to initiation in two-stage promotion. *Cancer Lett.* 1985 Oct;29(1):79-84.

Orend G, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer Lett.* 2006 Dec 8;244(2):143-63.

Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Rev.* 1989 Aug;8(2):98-101.

Papo N, Silverman AP, Lahti JL, Cochran JR. Antagonistic VEGF variants engineered to simultaneously bind to and inhibit VEGFR2 and $\alpha v\beta 3$ integrin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Aug 23;108(34):14067-72.

Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993 Dec;4(12):1317-26.

Peduto L. ADAM9 as a Potential Target Molecule in Cancer. *Current Pharmaceutical Design.* 2009 15(20):2282-7.

Peranzoni E, Rivas-Caicedo A, Bougherara H, Salmon H, Donnadieu E. Positive and negative influence of the matrix architecture on antitumor immune surveillance. *Cell Mol Life Sci.* 2013 Dec;70(23):4431-48.

Peus D, Vasa RA, Meves A, Pott M, Beyerle A, Squillace K, *et al.* H₂O₂ is an important mediator of UVB-induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1998 Jun; 110(6): 966-71.

Pietras K, Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res*. 2010 May 1;316(8):1324-31.

Pilorget A, Consea M, Sarray S, Michaud-Levesque J, Daoud S, Kim KS. *et al.* Lebectin, a Macrovipera lebetina venom-derived C-type lectin, inhibits angiogenesis both in vitro and in vivo. *Journal of cellular Physiology*. 2007 Nov; 211(2): 307-15.

Postovit LM, Seftor EA, Seftor RE, Hendrix MJ. Influence of the microenvironment on melanoma cell fate determination and phenotype. *Cancer Research*. 2006 Aug 15;66(16):7833-6.

Powell J. Update on hemangiomas and vascular malformations. *Curr Opin Pediatr*. 1999 Dec; 11(5): 457-63.

Primakoff P, Myles DG. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet*. 2000 Feb; 16(2):83-7.

Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci*. 2013 Nov 9;9(10):1057-69.

Ramos OHP, Kauskot A, Cominetti MR, Bechyne I, Pontes CSL, Chareyre F. *et al.* A novel $\alpha\beta 3$ -blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. *Clin. Exp. Metastasis*. 2008. Sep 14; 25(1): 53-64.

Regatieri CV, Dreyfuss JL, Melo GB, Lavinsky D, Farah ME, Nader HB. Dual Role of Intravitreal Infliximab in Experimental Choroidal Neovascularization: Effect on the Expression of Sulfated Glycosaminoglycans. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Nov;50(11):5487-94.

Rhodes AR, Weinstock MA, Fitzpatrick TB, Mihm MC Jr, Sober AJ. Risk factors for cutaneous melanoma: a practical method of recognizing individuals. *J Amer Med Ass*. 1987 Jun; 258(21): 3146-54.

Ria R, Reale A, Castrovilli A, Mangialardi G, Dammacco F, Ribatti D. *et al.* Angiogenesis and progression in human melanoma. *Dermatol Res Pract*. 2010;185687.

Saito Y; Shiota Y; Nishisaka M; Owaki T; Shimamura M; Fukai F. Inhibition of angiogenesis by a tenascin-c peptide which is capable of activating beta1-integrins. *Biol Pharm Bull*. 2008 May;31(5):1003-7.

Saldanha-Gama RF, Moraes JA, Mariano-Oliveira A, Coelho AL, Walsh EM, Marcinkiewicz C, *et al.* alpha(9)beta(1) integrin engagement inhibits neutrophil spontaneous apoptosis: involvement of Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jul; 1803(7):848-57.

Samples J, Willis M, Klauber-Demore N. Targeting angiogenesis and the tumor microenvironment. *Surg Oncol Clin N Am*. 2013 Oct;22(4):629-39.

Sarray S, Siret C, Lehmann M, Marrakchi N, Luis J, El Ayeb M, *et al.* Lebectin increases n-cadherin-mediated adhesion through PI3K/AKT pathway. 2009 Jul; 285(2): 174-81.

Seetharam L, Gotoh N, Maru Y, Neufeld G, Yamaguchi S, Shibuya M. A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF. *Oncogene*. 1995 Jan 5;10(1):135-47.

Selistre-de-Araujo HS, Pontes CLS, Montenegro CF, Martin ACBM. Snake venom disintegrins and cell migration. *Toxins*. 2010 Oct 29; 2(11): 2606-21.

Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res*. 1986 Nov;46(11):5629-32.

Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*. 1994 Dec 22-29;372(6508):786-91.

Shintani Y, Higashiyama S, Ohta M, Hirabayashi H, Yamamoto S, Yoshimasu T, *et al*. Overexpression of ADAM9 in non-small cell lung cancer correlates with brain metastasis. *Cancer Res*. 2004 Jun 15; 64(12):4190-6.

Soldi R, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G, Bussolino F. Role of α v β 3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO J*. 1999 Feb 15;18(4):882-92

Somanath PR, Malinin NL, Byzova TV. Cooperation between integrin α v β 3 and VEGFR2 in angiogenesis. *Angiogenesis*. 2009 Sep; 12(2):177-85.

Sortino-Rachou AM, Curado MP, Cancela Mde C. Cutaneous melanoma in Latin America: a population-based descriptive study. *Cad Saude Publica*. 2011 Mar;27(3):565-72.

Soucy PA, Romer LH. Endothelial cell adhesion, signaling and morphogenesis in fibroblast-derived matrix. *Matrix Biology*. 2009 Nov; 28(5): 273-83.

Spano D, Zollo M. Tumor microenvironment: a main actor in the metastasis process. *Clin Exp Metastasis*. 2012 Apr; 29(4):381-95.

Steele MM, Schieler AM, Kelley PM, Tempero RM. β 1 integrin regulates MMP-10 dependant tubulogenesis in human lymphatic endothelial cells. *Matrix Biology*. 2011 Apr;30(3):218-24.

Stephens TJ, Herndon JH Jr, Colón LE, Gottschalk RW. The impact of natural sunlight exposure on the UVB-sun protection factor (UVB-SPF) and UVA protection factor (UVA-PF) of a UVA/UVB SPF 50 sunscreen. *J Drugs Dermatol*. 2011 Feb;10(2):150-5.

Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009 Apr 9;458(7239):719-24.

Stuelten, C. H., Busch, J. I., Tang, B., Flanders, K. C., Oshima, A., Sutton, E., *et al*. Transient tumor–fibroblast interactions increase tumor cell malignancy by a TGF- β mediated mechanism in a mouse xenograft model of breast cancer. *PLoS One*. 2010 Mar 23;5(3):e9832.

Svobodová AR, Galandáková A, Sianská J, Doležal D, Lichnovská R, Ulrichová J. *et al.* DNA damage after acute exposure of mice skin to physiological doses of UVB and UVA light. *Arch Dermatol Res.* 2012 Jul;304(5):407-12.

Szala S, Jarosz M. Tumor blood vessels. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2011 Jul 4;65:437-46.

Takagi J, Springer TA. Integrin activation and structural rearrangement. *Immun Rev.* 2002 Aug;186:141-63.

Taraboletti G, Morbidelli L, Donnini S, Parenti A, Granger HJ, Giavazzi R. *et al.* The heparin binding 25 kDa fragment of thrombospondin-1 promotes angiogenesis and modulates gelatinase and TIMP-2 production in endothelial cells. *FASEB J.* 2000 Sep;14(12):1674-6.

Tian J, Paquette-Straub C, Sage EH, Funk SE, Patel V, Galileo D. *et al.* Inhibition of melanoma cell motility by the snake venom disintegrin eristostatin. *Toxicon.* 2007. Jun 1; 49(7): 899-08.

Trapp V, Parmakhtiar B, Papazian V, Willmott L, Fruehauf JP. Anti-angiogenic effects of revasterol mediated by decreased VEGF and increased TSP1 expression in melanoma-endothelial cell co-culture. *Angiogenesis.* 2010 Dec;13(4):305-15.

Trikha M, De Clerck YA, Markland FS. Contortrostatin, a snake venom disintegrin, inhibits beta 1 integrin-mediated human metastatic melanoma cell adhesion and blocks experimental metastasis. *Cancer Research.* 1994 Sep 15;54(18):4993-8.

van Dijk M, Göransson SA, Strömblad S. Cell to extracellular matrix interactions and their reciprocal nature in cancer. *Exp Cell Res.* 2013 Feb 16. pii: S0014-4827(13)00062-1.

Vempati P, Popel AS, Mac Gabhann F. Extracellular regulation of VEGF: Isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013 Nov 27. pii: S1359-6101(13)00098-1.

Xiong JP, Stehle T, Zhang R, Joachimiak A, Frech M, Goodman SL, *et al.* Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science.* 2002 Apr 5; 296:(5565):151-5.

Xiong J, Balcioglu HE, Danen EH. Integrin signaling in control of tumor growth and progression. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013 May;45(5):1012-5.

Warren BA, Shubik P. The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch. *Lab Invest.* 1996 Feb;15(2):464-78.

Weskamp G, Krätzschmar J, Reid MS, Blobel CP. MDC9, a widely expressed cellular disintegrin containing cytoplasmic SH3 ligand domains. *J Cell Biol.* 1996 Feb; 132(4):717-26.

- Wheellock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. 2008 Mar 15;121(Pt 6):727-35.
- Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT. *et al.* Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasculature effects in human rectal cancer. *Nat Med* 2004 Feb;10(2):145-47.
- Yamada D, Ohuchida K, Mizumoto K, Ohhashi S, Yu J, Egami T, *et al.* Increased expression of ADAM 9 and ADAM 15 mRNA in pancreatic cancer. *Anticancer Res.* 2007; 27(2):793-9.
- Yang P, Baker KA, Hagg T *Prog Neurobiol.* The ADAMs family: coordinators of nervous system development, plasticity and repair. 2006 Jun; 79(2):73-94.
- Yonekawa K, Harlan JM. Targeting leukocyte integrins in human diseases. *Journal Leukocyte of Biology.* 2005 Feb; 77(2):129-40.
- Yue J, Zhang K, Chen J. Role of Integrins in Regulating Proteases to Mediate Extracellular Matrix Remodeling. *Cancer Microenviron.* 2012 Dec;5(3):275-83.
- Yue PY, Mak NK, Cheng YK, Leung KW, Ng TB, Fan DT. Pharmacogenomics and the Yin/Yang actions of ginseng: anti-tumor, angiomodulating and steroid-like activities of ginsenosides. *Chin Med.* 2007 May 15;2:6.
- Zagzag D, Shiff B, Jallo GI, Greco MA, Blanco C, Cohen H. *et al.* Tenascin-C promotes microvascular cell migration and phosphorylation of focal adhesion kinase. *Cancer Res.* 2002 May 1;62(9):2660-8.
- Zhang J, Liu J. Tumor stroma as targets for cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics.* 2013 Feb;137(2):200-15.
- Zigrino P, Nischt R, Mauch C. The disintegrin-like and cysteine-rich domains of ADAM-9 mediate interactions between melanoma cells and fibroblasts. *J Biol Chem.* 2011 Feb 25; 286(8):6801-7.

APÊNDICE – Impact of tumor extracellular matrix on the functions of endothelial cells and their association with tumor-associated angiogenesis (Artigo científico)

Impact of tumor extracellular matrix on the functions of endothelial cells and their association with tumor-associated angiogenesis.

**Helal-Neto E.^{1,4}, Brandão-Costa R.M.^{2,4}, Saldanha-Gama R.², Ribeiro C.P.², Midlej V.³,
Benchimol M.³, Morandi V.¹, Barja-Fidalgo C.²**

1 Laboratory of angiogenesis, IBRAG, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil 2 Laboratory of Pharmacology Molecular and Cellular, IBRAG, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, and 3 Universidade Santa Úrsula, Rio de Janeiro, Brazil

4 These authors contributed equally to this study.

Abstract

Tumor progression creates a microenvironment that influences neighboring cell plasticity, migration and invasion and triggers the formation of new blood vessels from preexisting blood vessels, a process known as angiogenesis. This process depends on the production of growth factors by tumor cells that stimulate new blood vessel growth and survival. But, adhesion to the extracellular matrix is also important to regulate endothelial cell survival, proliferation and motility during angiogenesis. Integrins are the major protein adhesion molecules responsible for cell-matrix interactions and transduction molecular signals to regulate cell shape, survival and proliferation. However the interaction of tumor matrix and endothelial cells with tumor-associated angiogenesis is poorly studied yet. In our study, we evaluated the interactions between tumor-derived extracellular matrix and endothelial cells and how these interactions may impact events associated with tumor. In the present study, we did a characterization which showed differences between tumor-associated ECM, obtained from the human melanoma cell line (MV3) and the normal ECM, obtained from the human melanocyte cell line (NGM). Melanoma ECM modifies actin cytoskeleton dynamic, and inducing stress fiber formation on HMEC1, differently from NGM ECM. In transwell experiments, tumor ECM was able to increase endothelial cell transmigration. Tumoral ECM contributed to increase the proliferation of HMEC1 when related to normal ECM, corroborating with the increase in expression of phosphorylated AKT and FAK. We used Matrigel® to study HMEC1 tubulogenesis. We observed an increase in size and in number of tubular structures formed by HMEC1 cultured previously on tumor ECM and then cultured on Matrigel®. Finally, we showed an increase expression of phosphorilated VEGFR2, and an increase FAK association with c-Src, on HMEC1 cultured 24 hours on MV3 ECM,

suggesting that these events probably happen through integrins, and still these effects may be accentuated by a crosstalk between integrins and VEGFR2. In conclusion, these data suggest that tumor matrix change endothelial cell behavior, inducing angiogenesis through integrin activation. This response probably is potentiated by VEGFR2 activation.

Introduction

The surrounding microenvironment has strong influence on tumor progression. Tumor cells have the acquired ability to grow within the organ microenvironment, induce angiogenesis and colonize other tissues (Fidler, 2002). The recruitment of tumor stroma cells contributes to the development and expression of certain capabilities that assure tumor progression (Hanahan & Weinberg, 2011).

The tumor microenvironment consists of components as diverse as extracellular matrix (ECM) components, growth factors, including vascular endothelial growth factor, and different types of cells, like inflammatory and endothelial cells. Collectively, these pieces provide the architecture necessary for the establishment and growth of tumor cells. The relevance of each of these cell types on tumor behavior is surely multi-faceted and, thus, merits independent discussion and analysis (Okuyama & Inoue, 2011; Allen & Louise, 2011).

To form new 3D capillary networks, during angiogenesis, endothelial cells must proliferate, migrate and differentiate (Davis et al., 2002). The alignment among extracellular matrix, integrin receptors and cytoskeletal is necessary for a successful endothelial cell tube. The interplay between integrins and ECM proteins has been shown as a controller of angiogenic signals (Bussolino et al., 2009, Selistre-de-Araujo et al., 2010; Wang et al., 2011; Davis & Senger, 2005).

One of the earliest insights into the integrin activation is that integrin-mediated signaling boost tyrosine phosphorylation of a nonreceptor tyrosine kinase known as focal adhesion kinase (FAK) (Schaller et al., 1992). FAK activation initiate a series of intracellular signaling pathways related to cell adhesion, migration and differentiation (Braren et al., 2006; Tavora et al., 2010).

For a long time, ECM was considered only a stable structure that plays a mainly supportive role in maintaining tissue morphology. Multiple regulatory mechanisms exist to ensure that ECM dynamics are normal during organ development and function (Page-McCaw et al., 2007). The majority of ECM proteins mediate angiogenesis through arginine-glycine-

aspartic acid (RGD) motifs which bind to integrins that mediate outside-in signaling (Campbell et al., 2010). Recent study has also highlighted the importance of noncellular components, especially the ECM proteins, during cancer progression (Sternlicht et al., 1999; Levental et al., 2009). Indeed, abnormal ECM dynamics are one of the most ostensible clinical outcomes in diseases such as tissue fibrosis and cancer (Cox & Ertler, 2011). The role of the ECM as a dynamic and versatile component of the tumor stroma that influences fundamental aspects of cell biology have been extensively shown (Hynes, 2009, Soucy & Romer, 2009; Alves et al., 2011). An increased protease activity could trigger release of matrix bound growth factors such as VEGF, FGF, PDGF (Malinda et al., 1999) or the release of active fragments from EC, proteins. Some of these sequences promote early steps in angiogenesis through cell attachment to the ECM (Grant et al., 1994; Outeiro-Bernstein et al., 2002; Nunes et al., 2008).

Tumors require the ability to establish an angiogenic phenotype, which occurs via the disruption of the angiogenic switch. Data has shown that components of the ECM can have both pro and antiangiogenic effects (Campbell et al., 2010; Pirotte et al., 2011; Clarke et al., 2012; Barkan, 2010; Cooper & Sefton, 2011). ECM proteins drives capillary morphogenesis through sustained signaling, resulting in persistent cytoskeletal reorganization and changes in endothelial cell shape. Also, ECM scaffolds may function during angiogenesis to immobilize angiogenic cytokines and thereby coordinate signals transduced through both growth factor and ECM receptors (Davis & Senger, 2005). Angiogenesis requires degradation of the extracellular matrix, causing exposition of other LN isoforms that are usually not expressed or weakly expressed in most healthy tissues but are present in the abnormal microenvironment (Cimpean et al., 2011). Tenascin-C promotes microvascular cell migration and phosphorylation of focal adhesion kinase (Zagzag et al., 2002).

In the present work, we have focused on the signal for endothelial morphogenesis that may be provided by a decellularized, multi-component, matrix derived from a human melanoma lineage. We demonstrated that, when compared with a non-tumor-derived extracellular matrix, tumor-derived extracellular matrix promoted an increase in the adhesion, migration and proliferation of endothelial cell. Also, tumor-derived ECM induced stress fiber formation and an increase in FAK and Akt phosphorylation. Noteworthy, we showed that tumor-derived ECM improved tubulogenesis.

Materials and Methods

Chemicals.

HEPES, ethylenediaminetetraacetate (EDTA), bovine serum albumin (BSA), penicillin, streptomycin, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenol tetrazolium bromide (MTT), TRITC-labelled phalloidin, leupeptin, ribonuclease A (RNase A), antibodies against trombospondin-1 (TSP-1), laminin (LN), trypsin, MCDB-131 medium and trypan blue were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Triton X-100, PVDF membranes, RainbowTM were from GE Healthcare (San Francisco, CA). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Cultilab (Campinas, SP, Brazil). Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Trizol[®] reagent, anti-p-FAK³⁹⁷, anti-TN-C (tenascin-C), anti-FN (fibronectin) and DAPI prolong were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA). Antibodies against collagen I (ColI), collagen IV (Col IV), anti-p-AKT and secondary biotin-conjugated antibody were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Streptavidin-conjugated FITC and Streptavidin-conjugated FITC and Streptavidin-conjugated horseradish peroxidase were from Caltag Laboratories. ECL system (SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate kit) was from Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA). Panotic kit was from LB Laborclin (PR, Brazil). MatrigelTM was from BD Biosciences Labware (Bedford, MA). High Capacity cDNA Reverse Transcription was from Applied Biosystems. BCA was from Thermo Scientific. RNeasy Mini Kit, SYBR-green, *Hs_FLT1_1_SG* (cat.: QT00073540), *Hs_KDR_1_SG* (cat.: QT00069818) and *Hs_GAPDH_1_SG* (cat.: QT00079247) were from Qiagen.

Cell culture and culture media.

Human microvascular endothelial cells (HMEC-1) were a kind gift of Francisco Candal, Centers for Disease Control, Atlanta, GA. MV3 human melanoma cells were donated from Cezary Marcinkiewicz Temple University, Center for Neurovirology and Cancer Biology (PA, USA). NGM human melanocytes were obtained from Cell Bank of Rio de Janeiro (RJ, Brazil). HMEC1 were maintained in MCDB-131 supplemented with 10% FBS, endothelial

cell growth (EGF) (10 μ g/mL), hydrocortisone (10 μ g/mL), penicillin (0,5 U/mL), streptomycin (0,5mg/mL), HEPES (15mM), NaHCO₃ (14,04 mM) and L-glutamine (2mM). MV3 and NGM cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, NaHCO₃ (3,7g/L), HEPES (5,2g/L), penicillin (0,5 U/mL) and streptomycin (0,5mg/mL). Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5 % CO₂. Cells were grown to confluence into 75 cm culture flasks. MV3 were detached by brief treatment with 5 mM EDTA in Hank's balanced salt solution (HBSS) and NGM and HMEC1 were detached by brief treatment with trypsin (0,1%)/ EDTA (0,01%).

3D model of the matrix extraction.

Freshly immobilized ECM (from MV3 and NGM) were obtained as previously described (Morandi, 1994). Briefly, cells were seeded onto plastic (6, 24, 96-well plates) and grown until they reached confluence (about 72h). Monolayers were disrupted with cold lysis buffer (PBS-Ca²⁺, pH 7,4, containing 0.1% Triton X-100, 0,1 M NH₄OH, 10 μ L/mL of cocktail of inhibitors (10 μ g/ μ L of aprotinin, 10 μ g/ μ L of leupeptin and 2 μ g/ μ L of pepstatin) and 1mM of PMSF. Cell debris were washed twice with cold PBS-Ca²⁺ and wells were saturated with 0.1% BSA/PBS-Ca²⁺ for 1 h at 37 °C and used immediately.

Transmission electron microscopy of MV3 and NGM matrices.

The ECM was obtained as described above and it was washed gently in warm PBS pH 7,2, and fixed overnight in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7,2. Afterwards, the samples were washed in PBS and then post-fixed for 1 hour in 1% OsO₄, dehydrated in crescent grades of ethanol, critical point dried with liquid/gas CO₂, and sputter-coated with 15 nm-thick gold-palladium. The samples were observed with a JEOL 5800 scanning electron microscope using acceleration voltage of 25 KV.

Analysis of ECM composition by indirect ELISA.

The composition of immobilized matrices from different cells types was investigated by indirect ELISA, with the following primary antibodies: rabbit polyclonal against human laminin (1:5000), collagen I (1:35), and goat polyclonal against human collagen IV (1:500)

were from Sigma. Rabbit polyclonal antibody against human thrombospondin-1 R1 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was a generous gift of Dr. J. Lawler (Harvard Medical School, MA), and a rabbit polyclonal antibody against human collagen VI (1:4500). Rabbit polyclonal against human fibronectin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was from DAKO (Denmark). The mouse monoclonal antibody against human tenascin was from Sigma (1:8000). The secondary antibodies against rabbit IgG and mouse IgG were from Dako (1:2000). Immobilized matrices were blocked with 0.1% BSA/PBS- Ca^{2+} for 2 h and then incubated with specific primary antibodies diluted in PBS- Ca^{2+} /Tween 0.05% for 1 h, at room temperature. After washes with 0.1% BSA/PBS- Ca^{2+} /Tween 0.05%, HRP-conjugated secondary antibodies diluted in the same buffer were added for 1 h. Colorimetric reaction was determined by citrate buffer 0.1 M pH 4.5 containing 0.002% H_2O_2 and OPD 1 mg/mL, and was stopped with H_2SO_4 3 M. Absorbance was measured at 490 nm in an ELISA microplate automatic reader (Thermo Scientific).

Cell adhesion assay.

HMEC1 cells (1.5×10^4 cells/mL) were seeded, in serum-free medium, for 2 hours on freshly immobilized extracellular matrices. After washing, the number of adherent cells were determined by MTT assay as described (Nunes, 2008).

Analysis of focal adhesion/contact and stress fiber formation

HMEC1 (10^5 cells/mL) were seeded for 24 hours onto ECM produced on sterile glass coverlips. After washing, endothelial cells were fixed with paraformaldehyde/4% sucrose/PBS solution for 20 min at room temperature and, then, permeabilized with Triton X-100 (0.1%)/PBS for 5 min, washed with PBS and labeled with TRITC phalloidin (1:1000) for 2 h at room temperature. Glass coverslips were sequentially incubated with TRITC phalloidin (1:1000) for 2 h at room temperature. Finally, fixed cells were mounted using ProLong Gold antifade reagent with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for nuclear staining (Coelho et al., 2004). Coverslips were examined under an Olympus BX40 microscope equipped for epifluorescence.

Transwell Chamber Invasion Assay.

MV3 and NGM cells (5×10^4 cells/well) were seeded onto each insert of transwell (8 μm pore size filter membranes; Becton Dickinson), assembled in a 24-well plate (Falcon) for 72h. After preparation of freshly immobilized extracellular matrices, HMEC1 cells (3×10^4 cells/well) were added onto the upper chamber of each insert and let to migrated for 6 hours at 37°C and 5% CO_2 . As chemoattractant, 5% FBS-serum medium (MCDB-131) was added to the bottom chamber. After, non-invaded endothelial cells were removed with cotton swabs, while invaded cells on the lower surface of filters were fixed and stained with Panotic kit for counting. We quantified the migration assay as the number of cell that migrated through the insert and counted in an inverted microscope (Olympus IX71), 10 field in a 40x magnification.

Endothelial proliferation analysis.

HMEC1 (1×10^3 cells/well) were seeded for 48 hours on different matrices in the presence of medium with 10% FBS. After washing, number of cells was determined by MTT viability assay (Nunes, 2008).

Immunoblotting analysis.

HMEC1 (5×10^5) were seeded for 1, 6 or 24 hours on different extracellular matrices. To obtain the whole cell extracts, HMEC1 was suspended in proper lysis buffer (50 mM MES, pH 6.4, 1 mM , 10 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNase, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase, and the following protease inhibitors: 1 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM benzamidine, and 1 μM soybean trypsin inhibitor. The total protein concentration in samples was determined by BCA according manufacturers protocol. Cell lysates were denatured in sample buffer (50mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue) and boiled for 5 min. Samples (30 μg total protein) were resolved on 10% SDS-PAGE and proteins were transferred to polyvinylidenedifluoride (PVDF) membranes for western blot analysis. RainbowTM colored protein molecular weight markers

were run in parallel to estimate molecular weights. Membranes were blocked with Tween-TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 500 mM NaCl; 0.1% Tween 20; 5% BSA) overnight at 4°C. Primary antibodies used in western blot analysis were anti-p-FAK³⁹⁷ (1:500), anti-FAK, anti-p-Akt e anti-Akt (1:1000) overnight at 4°C. After extensive washing in Tween-TBS, membranes were incubated 1 hour with the appropriate secondary biotin-conjugated antibody (1:10000). After that, they were incubated with streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (1:10000) (Nascimento-Silva et al., 2007). Immunoreactive proteins were visualized using the ECL system. The densitometry of the entire band was quantified using the Photoshop software (Adobe Systems, San Jose, CA) and values obtained were expressed as arbitrary units (AU).

In vitro tubulogenesis assay

Basement membrane gels used for three-dimensional assays were formed by the polymerization of Matrigel for 30 min at 37°C. HMEC1 previously incubated on different cell-derived matrices for 24 hours were harvested by trypsinization and counted in a hemocytometer with trypan blue. Then, 5×10^4 cells/well were seeded onto growth factor-reduced Matrigel. After 8 hours, cultures were fixed 1,1% gluteraldehyde in PBS for 10 min, and the total number of tube-like structures/well was quantified by counting six high-power fields (10x magnification) in triplicate, by two independent observers.

RNA Extraction and qRT-PCR analysis.

HMEC1 was incubated for 24 and 48 hours with melanoma or melanocytes ECM. Then, total RNA of HEMC1 cells was extracted using the RNeasy Mini Kit. cDNA was generated from 1 µg RNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. The cDNA were amplified with Human gene-specific primers for FLT-1, KDR and GAPDH. The expression level of each candidate gene was internally normalized against that of the GAPDH. The relative quantitative value was expressed by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, representing the amount of the candidate gene expression with the same calibrators. qPCR was realized by Rotor Gene Q and amplicons were quantificated using Power SYBR® Green Master Mix kit. PCR was performed with 5 minutes at 95°C, later 40 cycles at 95°C and 60°C followed by a standard curve of denaturation.

VEGFR-2 expression on HMEC1.

HMEC1 (3×10^5) were seeded on ECM for 24 hours in the presence of 10% FBS in a 6-well plate. Then, cells were washed and allowed to remain on ECM for 12 hours in the presence of 2% FBS. Then, cells were let with medium M-199 0,1% of FBS for 6 hours to allowed maximum expression of VEGFR2. HUVECs were stimulated with a suboptimal dose of VEGF (30ng/mL) for 10 minutes. HMEC1 were lysates with a buffer lyses (Hepes 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, NaF 20mM, NaOV 1mM) and the total protein amount was measured using a BCA kit. Cell lysates were denatured in sample buffer (50mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue) and boiled for 5 min. Samples (30 μ g total protein) were resolved on 10% SDS-PAGE and proteins were transferred to polyvinylidenedifluoride (PVDF) membranes for western blot analysis. RainbowTM colored protein molecular weight markers were run in parallel to estimate molecular weights. Membranes were blocked with Tween-TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 500 mM NaCl; 0.1% Tween 20; 5% BSA) overnight at 4°C. Primary antibodies used in western blot analysis were anti-p-VEGFR2 Tyr¹¹⁷⁵ (1:500) and anti-tubulin (1:1000) overnight at 4°C. After extensive washing in Tween-TBS, membranes were incubated 1 hour with the appropriate secondary biotin-conjugated antibody (1:1000). After that, they were incubated with streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (1:10000) (Nascimento-Silva et al., 2007). Immunoreactive proteins were visualized using the ECL system. The densitometry of the entire band was quantified using the Photoshop software (Adobe Systems, San Jose, CA) and values obtained were expressed as arbitrary units (AU).

Immunoprecipitation

HMEC1 (5×10^5) were seeded for 24 hours on different extracellular matrices. Then cells were lysed in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1.5 mM EDTA, Triton X-100 (1%, v/v), glycerol (10%, v/v), aprotinin (10 mg/ml), leupeptin (10 mg/ml), pepstatin (2 mg/ml), and 1 mM PMSF. Lysates (2 mg of protein/ml) were incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal anti-FAK Ab (1:200). After that, protein A/G-agarose (10 μ l/sample) was added, and samples were incubated at 4°C in a rotator shaker for 2 h (Nascimento-Silva et al.,

2007). The contents of FAK and cSrc associated to FAK were analyzed by immunoblotting as described below.

Statistical analysis.

Statistical analysis, otherwise stated, was assessed by ANOVA and t-student, with $p < 0.05$ taken as statistically significant.

Results

Analyses of the extracellular matrix.

A qualitative analysis of the ECM, by indirect ELISA, showed that MV3 cells and NGM cells secrete different amounts of the extracellular proteins: laminin (LN), thrombospondin-1 (TSP-1), fibronectin (FN), collagen types IV and VI and tenascin-C (TN-C). We observed that MV3-derived matrix is, significantly, richer in LN (18x) and TN-C (8x) when compared with NGM-derived matrix. The differences in laminin, fibronectin and tenascin-c were confirmed by immunofluorescence (Fig. Suppl. 1). However, FN and TSP-1 were more present in the NGM-derived matrix (Fig. 1A). There were no differences in the expression of collagen I and collagen IV. We did not detect the presence of VEGF in neither extracellular matrix (data not shown). When we examined the spatial ultrastructure, we noted a clear difference among these two extracellular matrix. While MV3-derived matrix is thinner and organized in parallel bundles (Fig. 1B), NGM-derived matrix is compact and fibrous (Fig. 1C).

MV3 extracellular matrix increases HMEC1 adhesion, migration and proliferation

Endothelial cell adhesion on ECM regulates, through integrin activation, cellular events related to new blood vessel formation as proliferation, and motility (Pilorget et al., 2007). Thus, we tested the effects of the ECM produced by MV3 and NGM cells on HMEC1 cell adhesion. After 2 hours, we observed an increase in the number of adherent endothelial cells on melanoma-derived matrix (Fig. 2A). This increase in the adhesion is related to an increase in actin reorganization (Fig 2B).

Adhesion and cell morphology are governed by the actin cytoskeleton, which acts as a mechanical supporting framework, and alterations in actin dynamics is a hallmark of cell activation (Prasain & Stevens, 2009). To analyze changes in actin polymerization, we analyzed the cellular distribution of F-actin in HMEC1 cells incubated during 24 hours on ECM produced by NGM or MV3 cells. We observed that the ECM produced by MV3 induced profound alterations in actin cytoskeleton reorganization, leading to stress fibers formation course through the cytosol and reducing cortical ring. When HMEC1 was seeded on top ECM produced by NGM cells we observed a transitional phenotype. In this case, we visualized cells with their lamellipodia, but we also observed cells with stress fibers through the cytosol (Fig. 2B).

Typically, angiogenesis consists of basement membrane degradation, endothelial cell migration into perivascular space, proliferation and alignment to form capillary-like structures, (Folkman, 2001). In fact, we observed that ECM produced by MV3 cells significantly increased the migration capacity of HMEC1 through that matrix, comparing with HMEC1 migration through ECM produced by NGM cells (Fig. 2C and D). In addition, when HMEC1 cells were seeded on MV3-derived matrix we observed an increase in cell proliferation when compared with cells seeded on NGM-derived matrix (Fig 2E).

Effects of MV3 - extracellular matrix on the expression of pAKT and pFAK in HMEC1.

Binding of extracellular matrix protein to integrin leads to FAK autophosphorylation, initiating a cascade of intracellular events, as PI3K/Akt pathway, known to be involved in cell adhesion, migration and differentiation (Hunttenlocher & Horwitz, 2011). We observed that, after 1 hour on melanoma-derived matrix, there was an increase in FAK and Akt phosphorylation in HMEC1 cells (Fig. 3 A, C and D). This enhance of FAK and Akt phosphorylation induced by melanoma derived-matrix was also seen after 6 hours of interaction with the endothelial cell. After 24 hours of interaction, this effect was maintained for FAK activation (Fig. 3B although Akt phosphorylation presented less intensity when compared with 1 hour group (Fig. 3E). The increase in pFAK and pAkt expression corroborate, respectively, with the increase formation of stress fibers and migration in endothelial cells seeded onto MV3 ECM.

MV3 – derived matrix induces tubulogenesis in HMEC1 cells

In order to investigate if melanoma-derived matrix could activate endothelial cells to an angiogenic profile, we allowed HMEC1 cells to interact for 24 hours with MV3 or NGM-derived matrix. Then, cells were transferred to wells fulfilled with matrigel for 8 hours. Interestingly, extracellular matrix produced by MV3 increased the formation of capillary-like structures by HMEC1 cells when we compared with control group. Melanoma-derived matrix could activate a pool of integrins capable of transactivate others receptors involved with angiogenesis process, like tyrosine kinase receptors, as for exemple KDR and flt-1 (Koch et al., 2011). However, we could not verify any difference in the expression of KDR (Fig. 5A) nor flt-1 (Fig. 5B) in endothelial cells seeded during 24 or 48 hours on MV3- or NGM-derive matrix. Noteworthy, when we examined the activity of KDR 24 hour after the interaction of endothelial cell and melanoma-derived matrix, we verified an increase in the sensitization of KDR to VEGFA. A suboptimal dose of VEGFA was able to induce KDR phosphorylation in endothelial cell on melanoma-derived matrix (Fig. 6).

Intracellular protein Src has been shown as a significant link between integrin and VEGFR receptors (Galvagni *et al*, 2010). In our model, we observed an increase in the association of Src to FAK in endothelial cell stimulated by melanoma-derived matrix (Fig. 7).

Discussion

The importance of extracellular matrix as an essential noncellular component of the tumor microenvironment has gained great emphasis in the last 10 years. The biomechanical properties of ECM yield signals that maintain cell physiology. However, ECM also change under disease conditions. In addition to changes in its biochemical properties, the architecture of tumor-associated ECM is different from that of the normal tissue stroma. As a disorganized organ, tumor develops by using many of the same cellular and developmental processes essential for organogenesis (Ruoslahti, 2002; Egeblad et al., 2010). Furthermore, tumor vasculature is the main route through which cancer cells metastasize and immune cells infiltrate.

The propose of this study was to demonstrate how a reactive matrix, derived from melanoma, could influence the behavior of endothelial cell, an important cell constituent of the tumor stroma, favoring tumor-associated angiogenesis. Characterization of the extracellular matrix revealed considerable differences in the components and spatial

organization of ECM. In this work, we verified an increase in the levels of TN-C and LN and a decrease of FN and TSP-1 in the melanoma-derived matrix when compared to melanocyte-derived matrix.

The lower levels of fibronectin and TSP-1 on tumoral ECM could be related to cell-cell adhesion and cellular homeostasis. The presence of TSP-1 has been shown as an inhibitor of angiogenesis *in vivo* (Bornstein, 2001, Bornstein & Sage, 1994). Laminins are multifunctional matrix molecules with several sequences widely expressed forming the major scaffold of the basement membrane (Yurchenco & Patton, 2009). Overexpression of LN by transfection in human colon adenocarcinoma cells increased angiogenesis and growth of the arising tumours and promoted recruitment of stromal cells (De Arcangelis et al., 2001). Tenascin-C (TN-C) is a matricellular protein that can induce an intermediary cell adhesion to the substrate, facilitating cell migration and proliferation (Murphy-Ullrich, 2001). Our group has already demonstrated that ECM produced by glioma promotes the selection of highly proliferative and tubulogenesis-defective HUVECs (Alves et al., 2011). This effect was due an increase in the TN-C:FN ratio. Studies indicated that TN-C induces loss of endothelial focal adhesions leading to cell migration (ZagZag et al., 2002). In disparity, Saito et al. 2008 described that TN-C through an integrin pathway inhibits cell proliferation. These contradictory data may depend on the experimental conditions, such as the cell type used and the method of exposure to TN-C.

In this study, we showed that endothelial cell seeded onto melanoma-derived matrix presented an increase in the adhesion, migration and proliferation when compared to endothelial cell seeded onto a melanocyte-derived matrix. These responses could be due to differences in the integrin activation during cell-ECM interactions. The difference between the two ECM did not limit to the protein level. We demonstrated a substantial disparity related to the architecture of the extracellular matrix. Thus, the ECM proteins may be distributed in a specific manner on each matrix and may result in the exposure of new binding sites to integrin.

Previous studies using fibroblast and endothelial cells, have shown a dominant role for FAK upstream of the PI3K/Akt and MAPKs signaling pathway upon integrin activation (Xia et al, 2004, Jean et al., 2014, Yoshizuka et al, 2012 Somanath et al, 2006). In our study, we showed an increase in FAK and Akt phosphorylation together with a reorganization of the actin cytoskeleton in endothelial cells on melanoma-derived matrix. These results imply the involvement of integrin that could activate FAK, leading to Akt phosphorylation. This integrin-

dependent pathway could regulate melanoma-derived matrix effect on HMEC1 migration and proliferation. The integrins $\alpha v\beta 3$, $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 6\beta 1$ bind to LN and, cooperatively, promote endothelial adhesion and migration (Gonzalez et al., 2002). Similarly, overexpression of the LN $\alpha 4$ chain in human dermal microvascular EC promoted cell spreading and migration in a scratch wound assay and accelerated angiogenic tube formation in collagen gel overlay assays (Li et al., 2006). TN-C expressed by migrating endothelial cells suggests a potential role for TN-C in pathological angiogenesis. Endothelial cells adhere to TN-C, in part through $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 9\beta 1$ integrins which are implicated in angiogenesis. Cauterization-induced neovascularization in corneal stroma in vivo is attenuated in tenascin-C knockout mice in association with suppressed expression of angiogenic growth factors (Sumioka et al., 2011). Here, we showed that after 24 hours seeded on melanoma-derived matrix, endothelial cells presented a higher capillary-like structures ability than endothelial cells seeded on melanocyte-derived matrix. Melanoma-derived matrix did not alter expression of KDR nor FLT-1 in endothelial cell. However, we observed that KDR was more susceptible to low doses of VEGF. This could explain the increase in tubulogenesis on matrigel, despite the expression of this receptor remained unaltered.

In ECM remodeling, growth factors and proteases may be release and, together with integrin, coordinate tumour angiogenesis (Ramjaun & Hodivala-Dilke, 2009). FAK is a common molecule among endothelial growth factor receptors and integrins signalling pathways (Mitra et al, 2005). The convergence of these pathways on FAK suggests its role in blood vessel development during tumor growth. Deletion of EC-specific FAK affected tubulogenesis, decreased cell survival, proliferation and migration (Shen et al, 2005; Tavora et al., 2010). FAK activation by a signaling complex containing integrin $\alpha v\beta 5$ in a Src-dependent manner is essential for VEGF effect (Jin et al., 2005). Our results demonstrated that melanoma-derived matrix induced the association of Src to FAK in HMEC-1 cells. It is possible that integrin activation by melanoma ECM on endothelial cell could transactivate VEGFR2 allowing it to respond, effectively, to suboptimal doses of VEGF. This could explain why melanoma-derived matrix promoted an increase of tubulogenesis on HMEC-1 in matrigel with reduced levels of growth factor.

ECM components play different roles in blood vessel formation during normal development. For example, many ECM fragments derived from collagens type IV and XVIII, have potent stimulatory or inhibitory effects on angiogenesis (Mott and Werb, 2004). They are likely to collaborate with other pro- or antiangiogenic factors, including VEGF, to

determine where to initiate vascular branching and the final branch pattern. In addition to guiding endothelial cell migration and branching, ECM and its fragments may be involved in endothelial cell survival and proliferation. However, most of the studies towards ECM functions use bidimensional substrates that lack in aspects as spatial organization and associations with other ECM proteins. In our study, we utilized as a study model the ECM produced by a human melanoma or a human melanocyte lineage. Thus, we believe that the main characteristics of ECM were kept intact as well as the interactions, specially via integrins, of endothelial cell to ECM.

Selective blockade of integrins is a desirable goal for the therapy of a number of pathological conditions, including inflammation and tumor progression (Oliveira-Ferrer et al., 2013; Goodman & Picard, 2012). Our next step is to identify which integrin is involved in the effect of melanoma ECM on endothelial cell. For this, we will use disintegrins, selective ligands of integrins, as a biological tool with therapeutic potential. A RGD-disintegrin, DisBa-01, impaired VEGF signaling through Blocking avb3 (Montenegro et al., 2012). The promising therapeutic approach of blocking tumor neovascularization by targeting integrins has been extensively explored (Marcinkiewicz et al., 2003; Swenson et al., 2007).

The data presented here suggest a possible mechanism by which melanoma-derived matrix exerts its effects on endothelial cell, favoring angiogenesis in the tumor microenvironment. We suggest that, in the tumor microenvironment, melanoma-derived matrix activates integrin-dependent pathways in endothelial cells promoting a cytoskeleton rearrangement, migration and proliferation – initial events in the angiogenesis process. Also, integrin activation might induce the association of Src to FAK activating VEGFR2 in an inside-out manner, sensitizing this receptor to respond at suboptimal levels of VEGF and inducing differentiation of endothelial cells (Fig 8).

References

- Allen M, Louise JJ. Jekyll and Hyde: The role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol.* 2011 Jan;223(2):162-76
- Alves TR, da Fonseca AC, Nunes SS, da Silva AO, Dubois LG, Faria J, Kahn SA, Viana NB, Marcondes J, Legrand C, Moura-Neto V, Morandi V. Tenascin-C in the extracellular matrix promotes the selection of highly proliferative and tubulogenesis-defective endothelial cells. *Experimental Cell Res.* 2011 Sep 10;317(15):2073-85.
- Barkan D, Green JE, Chambers AF. Extracellular matrix: A gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. *Eur J Cancer.* 2010 May; 46(7):1181-88.
- Bornstein P and Sage EH. Thrombospondins. *Method Enzymol.* 1994;245:62-85.
- Bornstein, P. Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J. Clin. Invest.* 2001 Apr;107(8):929-34.
- Braren R, Hu H, Kim YH, Beggs HE, Reichardt LF, Wang R. Endothelial FAK is essential for vascular network stability, cell survival, and lamellipodial formation. *J Cell Biol.* 2006 Jan 2;172(1):151-62.
- Bussolino F, Caccavari F, Valdembri D, Serini G. Angiogenesis: a balancing act between integrin activation and inhibition? *Eur. Cytokine Netw.,* 2009 Dec;20(4):191-6.
- Campbell NE, Kellenberger L, Greenaway J, Moorehead RA, Linnerth-Petrik NM, Petrik J. Extracellular matrix proteins and tumor angiogenesis. *Journal of Oncology.* 2010 Jun 29; 53(5); 586-96.
- Clarke DN, Al Ahmad A, Lee B, Parham C, Auckland L, Fertala A, Kahle M, Shaw CS, Roberts J, Bix GJ. Perlecan Domain V Induces VEGF Secretion in Brain Endothelial Cells through Integrin $\alpha 5\beta 1$ and ERK-Dependent Signaling Pathways. *PLoS One.* 2012;7(9):e45257.
- Coelho AL, De Freitas MS, Mariano-Oliveira A, Rapozo DC, Pinto LF, Niewiarowski S, Zingali RB, Marcinkiewicz C, Barja-Fidalgo C. RGD- and MLD-disintegrins, jarastatin and EC3, activate integrin-mediated signaling modulating the human neutrophils chemotaxis, apoptosis and IL-8 gene expression. *Exp. Cell. Res.* 2004 Jan 15;292(2):371-84.
- Cooper TP, Sefton MV. Fibronectin coating of collagen modules increases in vivo HUVEC survival and vessel formation in SCID mice. *Acta Biomater.* 2011 Mar;7(3):1072-83.
- Cox TR, Erler JT. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: Implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech.* 2011 Mar;4(2):165-78.
- Davis GE, Bayless KJ, Mavila A. Molecular basis of endothelial cell morphogenesis in three-dimensional extracellular matrices. *Anat Rec.* 2002 Nov 1;268(3):252-75.

Davis GE, Senger DR. Endothelial Extracellular Matrix Biosynthesis, Remodeling, and Functions During Vascular Morphogenesis and Neovessel Stabilization. *Circulation Research*. 2005 Nov 25;97(11):1093-107.

De Arcangelis A, Lefebvre O, Méchine-Neuville A, Arnold C, Klein A, Rémy L, Kedinger M, Simon-Assmann P. Overexpression of laminin alpha1 chain in colonic cancer cells induces an increase in tumor growth. *Int J Cancer*. 2001 Oct 1;94(1):44-53

Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: Complex tissues that interface with the entire organism. *Dev. Cell*. 2010 Jun 15;18(6):884-901.

Fidler IJ. Critical determinants of metastasis. *Semin Cancer Biol* 2002 Apr;12(2):89-96.

Folkman J. A new family of mediators of tumor angiogenesis. *Cancer Invest*. 2001;19(7):754-5

Galvagni F, Pennacchini S, Salameh A, Rocchigiani M, Neri F, Orlandini M, Petraglia F, Gotta S, Sardone GL, Matteucci G, Terstappen GC and Oliviero S. Endothelial Cell Adhesion to the Extracellular Matrix Induces c-Src-Dependent VEGFR-3 Phosphorylation Without the Activation of the Receptor Intrinsic Kinase Activity. *Circ Res*. 2010;106:1839-1848.

Goodman SL, Picard M. Integrins as therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci*. 2012 Jul;33(7):405-12.

Gonzalez AM, Gonzales M, Herron GS, Nagavarapu U, Hopkinson SB, Tsuruta D, Jones JC. Complex interactions between the laminin alpha 4 subunit and integrins regulate endothelial cell behavior in vitro and angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Dec 10;99(25):16075-80.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011 Mar 4;144(5):646-74.

Huttenlocher A, Horwitz AR. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Sep 1;3(9):a005074.

Hynes RO. The extracellular matrix: Not just pretty fibrils. *Science*. 2009 Nov 27;326(5957):1216-9.

Jean C, Chen XL, Nam JO, Tancioni I, Uryu S, Lawson C, Ward KK, Walsh CT, Miller NL, Ghassemian M, Turowski P, Dejana E, Weis S, Cheresh DA, Schlaepfer DD. Inhibition of endothelial FAK activity prevents tumor metastasis by enhancing barrier function. *J Cell Biol*. 2014 Jan 20;204(2):247-63.

Jin YJ, Park I, Hong IK, Byun HJ, Choi J, Kim YM, Lee H. Fibronectin and vitronectin induce AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression through integrin $\alpha(5)\beta(1)/\alpha(v)\beta(3)$ -dependent Akt, ERK and JNK signaling pathways in human umbilical vein endothelial cells. *Cell Signal*. 2011 Jan;23(1):125-3

Juliano RL. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2002;42:283-323.

Koch S, Tugus S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Biochem J. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J*. 2011 Jul 15;437(2):169-83.

Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, Fong SF, Csiszar K, Giaccia A, Weninger W, Yamauchi M, Gasser DL, Weaver VM. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 2009 Nov 25;139(5):891-906.

Li J, Zhou L, Tran HT, Chen Y, Nguyen NE, Karasek MA, Marinkovich MP. Overexpression of laminin-8 in human dermal microvascular endothelial cells promotes angiogenesis-related functions. *J Invest Dermatol*. 2006 Feb;126(2):432-40

Malinda KM, Nomizu M, Chung M, Delgado M, Kuratomi Y, Yamada Y, Kleinman HK, Ponce ML. Identification of laminin alpha1 and beta1 chain peptides active for endothelial cell adhesion, tube formation, and aortic sprouting. *FASEB J*. 1999 Jan;13(1):53-62.

Marcinkiewicz C, Weinreb PH, Calvete JJ, Kisiel DG, Mousa SA, Tuszynski GP, Lobb RR. Obtustatin, a potent inhibitor of $\alpha1\beta1$ integrin in vitro and angiogenesis in vivo. *Cancer Res*. 2003 May 1;63(9):2020-3.

Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: In command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2005 Jan;6(1):56-68.

Montenegro CF, Salla-Pontes CL, Ribeiro JU, Machado AZ, Ramos RF, Figueiredo CC, Morandi V, Selistre-de-Araujo HS. Blocking $\alpha v\beta 3$ integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells. *Biochimie*. 2012 Apr 19; 94(12): 1812-20.

Morandi V, Cherradi SE, Lambert S, Fauvel-Lafève F, Legrand YJ, Legrand C. Proinflammatory cytokines (interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha) down regulate synthesis and secretion of thrombospondin by human endothelial cells. *J. Cell. Physiol*. 1994 Aug;160(2):367-77.

Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2004 Oct;16(5):558-64.

Murphy-Ullrich JE. *J Clin Invest*. The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? 2001 Apr;107(7):785-90. Review

Nascimento-Silva V, Arruda MA, Barja-Fidalgo C, Fierro IM. Aspirin-triggered lipoxin A4 blocks reactive oxygen species generation in endothelial cells: a novel antioxidative mechanism. *Thromb. Haemost.* 2007 Jan;97(1):88-98.

Nunes SS, Outeiro-Bernstein MA, Juliano L, Vardiero F, Nader HB, Woods A, Legrand C, Morandi V. Syndecan-4 contributes to endothelial tubulogenesis through interactions with two motifs inside the pro-angiogenic N-terminal domain of thrombospondin-1. *J Cell Physiol.* 2008 Mar;214(3):828-37.

Oliveira-Ferrer L, Wellbrock J, Bartsch U, Penas EM, Hauschild J, Klokow M, Bokemeyer C, Fiedler W, Schuch G. Combination therapy targeting integrins reduces glioblastoma tumor growth through antiangiogenic and direct antitumor activity and leads to activation of the pro-proliferative prolactin pathway. *Mol Cancer.* 2013 Nov 20;12(1):144.

Okuyama H, Inoue M. Hypoxic microenvironment and cancer dormancy. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2011 Oct;38(10):1559-64.

Oommen S, Gupta SK, Vlahakis NE. Vascular endothelial growth factor- A (VEGF-A) induces endothelial and cancer cell migration through direct binding to integrin $\alpha 9\beta 1$: Identification of a specific $\alpha 9\beta 1$ binding site. *J Biol Chem.* 2011 Jan 14;286(2):1083-92.

Outeiro-Bernstein MA; Nunes SS; Andrade AC; Alves TR; Legrand C; Morandi V. A recombinant NH2-terminal heparin-binding domain of the adhesive glycoprotein thrombospondin-1, promotes endothelial tube formation and cell survival: a possible role for syndecan-4 proteoglycan. *Matrix Biology.* 2002 Jun;21(4):311-24

Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Mar;8(3):221-33.

Pilorget A, Consea M, Sarray S, Michaud-Levesque J, Daoud S, Kim KS. *et al.* Lebectin, a Macrovipera lebetina venom-derived C-type lectin, inhibits angiogenesis both in vitro and in vivo. *Journal of cellular Physiology.* 2007 Nov; 211(2): 307-15.

Pirotte S, Lamour V, Lambert V, Alvarez Gonzalez ML, Ormenese S, Noël A, Mottet D, Castronovo V, Bellahcène A. Dentin matrix protein 1 induces membrane expression of VE-cadherin on endothelial cells and inhibits VEGF-induced angiogenesis by blocking VEGFR-2 phosphorylation. *Blood.* 2011 Feb 24;117(8):2515-26.

Prasain N, Stevens T. The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvasc Res.* 2009 Jan;77(1):53-63.

Ramjaun AR, Hodivala-Dilke K. The role of cell adhesion pathways in angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Mar;41(3):521-30

Ruoslahti E. Specialization of tumour vasculature. *Nat. Rev. Cancer.* 2002 Feb;2(2):83-90.

Saito Y, Shiota Y, Nishisaka M, Owaki T, Shimamura M, Fukai F. Inhibition of angiogenesis by a tenascin-c peptide which is capable of activating beta1-integrins. *Biol Pharm Bull.* 2008 May;31(5):1003-7.

Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, Parsons JT. pp125FAK, a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jun 1;89(11):5192-6.

Selistre-de-Araujo HS, Pontes CLS, Montenegro CF, Martin ACBM. Snake venom disintegrins and cell migration. *Toxins.* 2010 Oct 29; 2(11): 2606-21.

Shen TL, Park AY, Alcaraz A, Peng X, Jang I, Koni P, Flavell RA, Gu H, Guan JL. Conditional knockout of focal adhesion kinase in endothelial cells reveals its role in angiogenesis and vascular development in late embryogenesis. *J Cell Biol.* 2005 Jun 20;169(6):941-52

Somanath PR, Razorenova OV, Chen J, Byzova TV. Akt1 in endothelial cell and angiogenesis. *Cell Cycle.* 2006 Mar;5(5):512-8.

Soucy PA, Romer LH. Endothelial cell adhesion, signaling and morphogenesis in fibroblast-derived matrix. *Matrix Biology.* 2009 Nov; 28(5): 273-83.

Sternlicht MD, Lochter A, Sympton CJ, Huey B, Rougier JP, Gray JW, Pinkel D, Bissell MJ, Werb Z. The stromal proteinase MMP3/ stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell.* 1999 Jul 23;98(2):137-46.

Sumioka T, Fujita N, Kitano A, Okada Y, Saika S. Impaired angiogenic response in the cornea of mice lacking tenascin-C. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Apr 16;52(5):2462-7.

Swenson S, Ramu S, Markland FS. Anti-angiogenesis and RGD-containing snake venom disintegrins. *Curr. Pharm. Des.* 2007;13(28):2860-71.

Tavora B, Batista S, Reynolds LE, Jadeja S, Robinson S, Kostourou V, Hart I, Fruttiger M, Parsons M, Hodivala-Dilke KM. Endothelial FAK is required for tumour Angiogenesis. *EMBO Mol Med.* 2010 Dec;2(12):516-28.

Tucker MA. Melanoma epidemiology. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009 Jun;23(3):383-95.

Xia H¹, Nho RS, Kahm J, Kleidon J, Henke CA. Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a beta 1 integrin viability signaling pathway. *J Biol Chem.* 2004 Jul 30;279(31):33024-34.

Wang Y, Yan W, Lu X, Qian C, Zhang J, Li P, Shi L, Zhao P, Fu Z, Pu P, Kang C, Jiang T, Liu N, You Y. Overexpression of osteopontin induces angiogenesis of endothelial

progenitor cells via the $\alpha v\beta 3$ /PI3K/AKT/eNOS/NO signaling pathway in glioma cells. *Eur J Cell Biol.* 2011 Aug;90(8):642-8.

Yoshizuka N, Chen RM, Xu Z, Liao R, Hong L, Hu WY, Yu G, Han J, Chen L, Sun P. A novel function of p38-regulated/activated kinase in endothelial cell migration and tumor angiogenesis. *Mol Cell Biol.* 2012 Feb;32(3):606-18.

Yurchenco PD, Patton BL. Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Curr Pharm Des.* 2009;15(12):1277-94. Review

Zagzag D, Shiff B, Jallo GI, Greco MA, Blanco C, Cohen H, Hukin J, Allen JC, Friedlander DR. Tenascin-C promotes microvascular cell migration and phosphorylation of focal adhesion kinase, *Cancer Res.* 2002 May 1;62(9):2660-8.

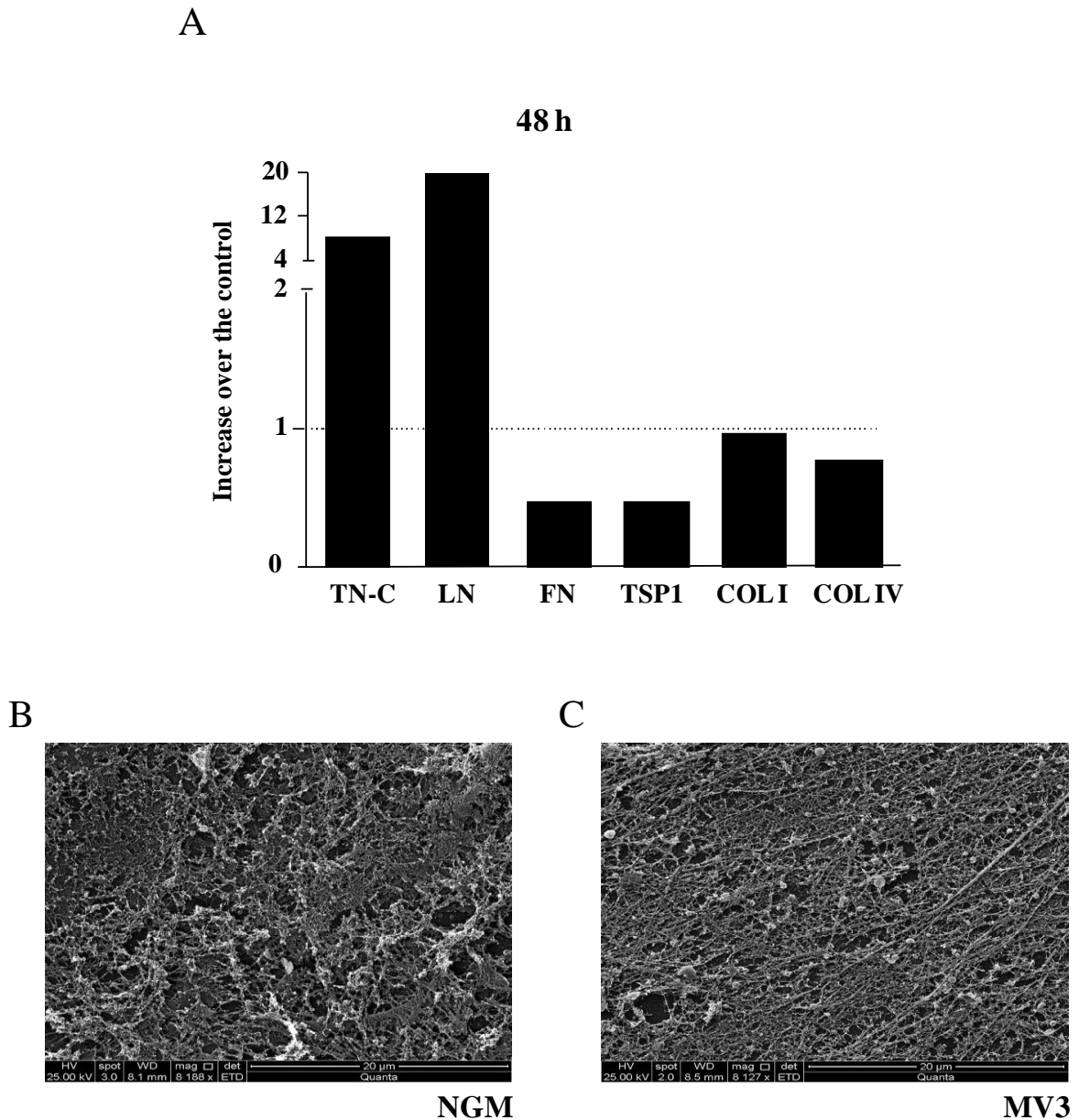
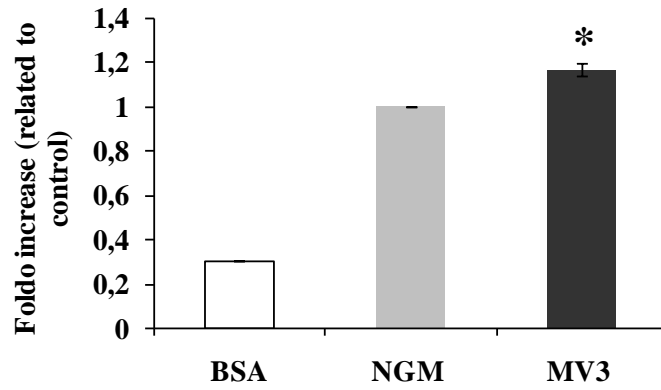


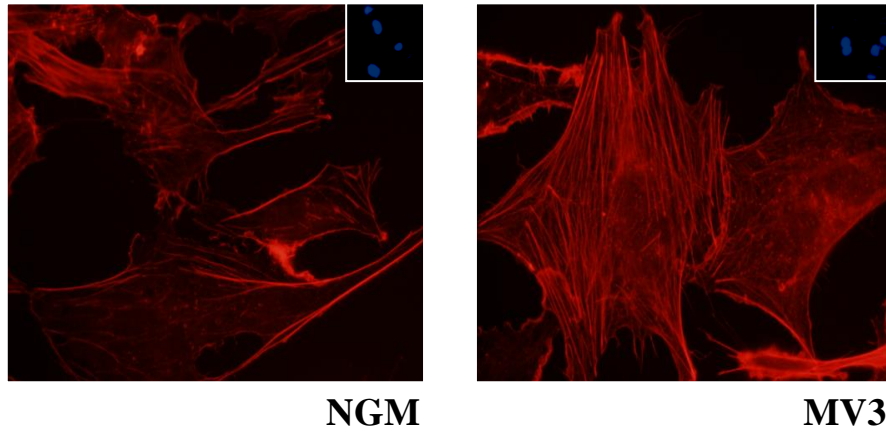
Figure 1. (A) MV3 or NGM cells were grown in 96-well plates during 48 hours. Cells were lysed to obtain the extracellular matrix. The presence of tenascin-c (TN-C), trombospondin (TSP), laminin (LN), fibronectin (FN), collagen I (Col I) and collagen IV (Col IV) in matrix were determined by performing an ELISA assay, using specific antibodies for each matrix protein. Results are shown as fold increase related to NGM-derived matrix group. The graph is representative of 3 independent experiments. (B and C) MV3 and NGM cells were grown during 72 hours. Cells were lysed. Then, it was washed gently in warm PBS, and then fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer. Afterwards, the samples were washed in PBS and then post-fixed for 1 h in 1% OsO₄, dehydrated in crescent grades of ethanol, critical

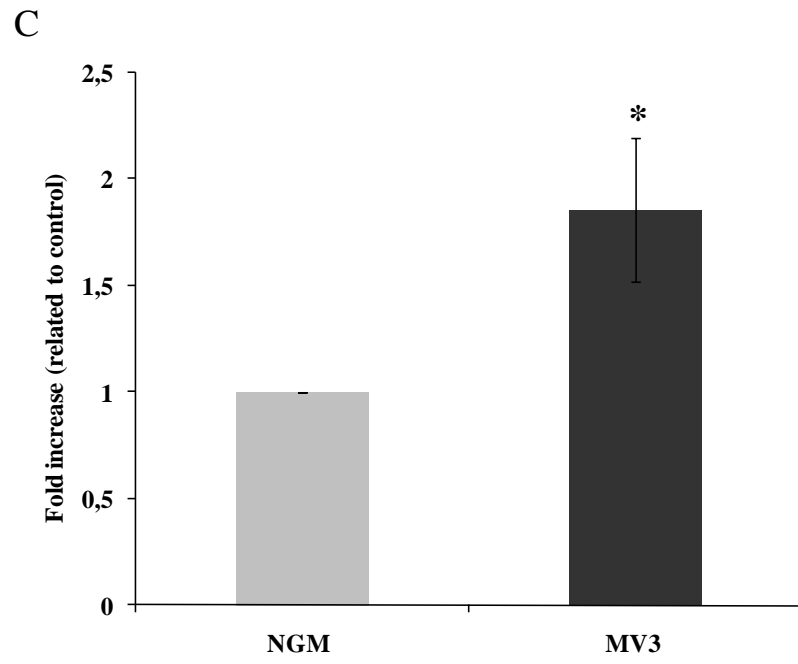
point dried with liquid/gas CO₂, and sputter-coated with 15 nm-thick gold-palladium. The samples were observed with a JEOL 5800 scanning electron microscope using acceleration voltage of 25 KV. Images was done at 8000x magnification.

A

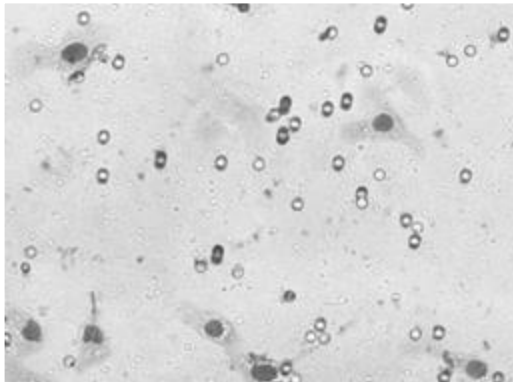


B

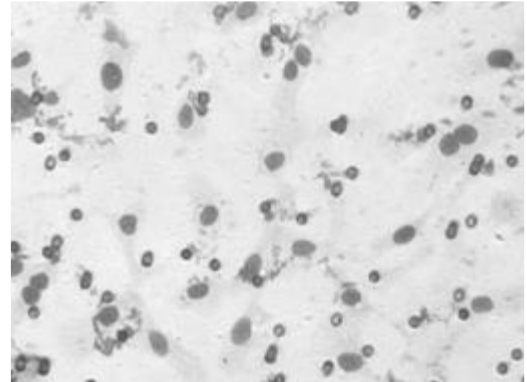




D



NGM



MV3

E

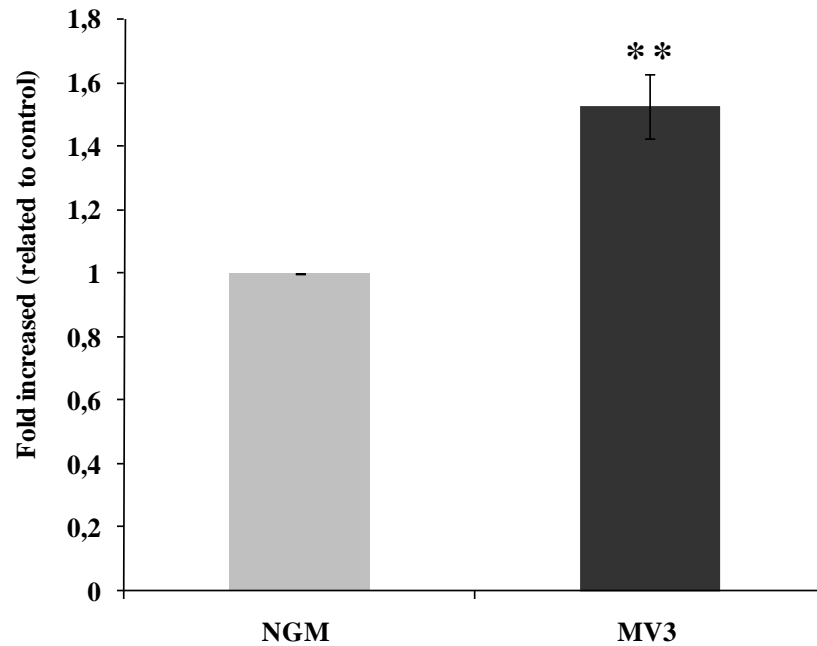
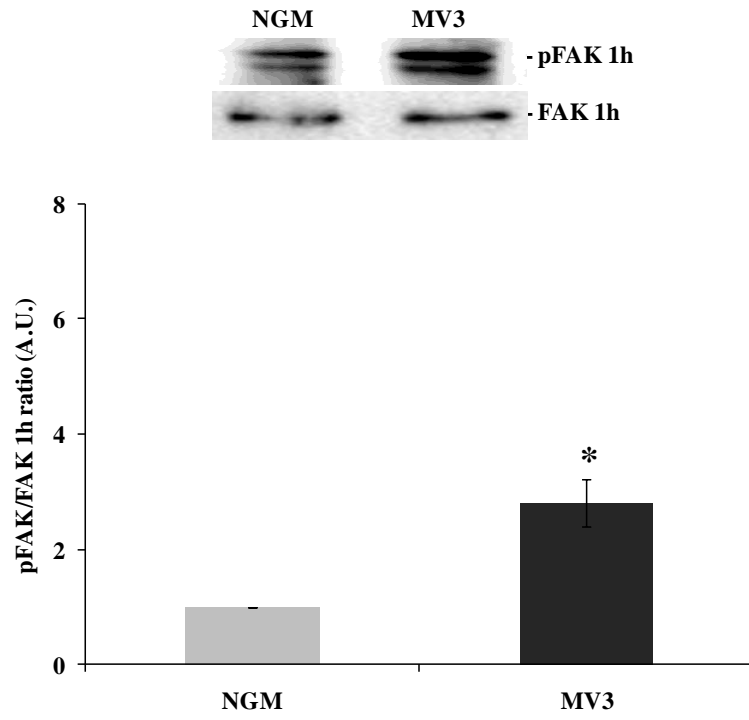
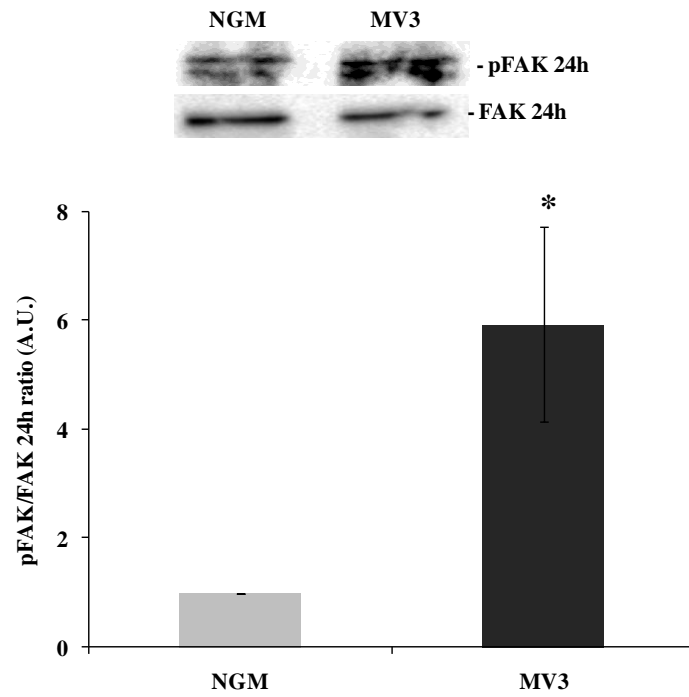


Figure 2. (A) MV3 and NGM cells were cultured on 96-well plates for 72hs. After incubation, cells were extracted as described before to obtain the extracellular matrix. Then, Endothelial cells (HMEC1) were seeded, for 2 hours, on these matrix. Adherent cells were determined by MTT viability assay and read at 570nm. (B) MV3 or NGM cells were grown during 72 hours. Cells were lysed and HMEC1 was seeded on each matrix for 24 hours. Then, cells were fixed, permeabilized and labeled with TRITC-labeled phalloidin. Microscopic analyses of fluorescent images was done at 60x magnification. (C) MV3 and NGM cells were cultured on transwell inserts for 72h. Then, cells were extracted to obtain the extracellular matrix and HMEC1 were added into insert and let to migrated for 6h. As chemoattractant, 5% FBS-serum medium was used. After 6h, HMEC1 were fixed and stained with panoptic kit for counting. We quantified the migration assay as the number of cell that migrated through the insert and counted in a inverted microscope (Olympus IX71), 10 field in a 40x magnification. (D) Representative images of transwell. (E) MV3 and NGM were cultured in 96-well plates for 24h. After this, cells were lysed for obtaining the ECM. HMEC1 were plated in quintuplicate on the matrix and incubated for 48h. Viable cells were determined by MTT viability assay. Optical density value was readed at 570 nm. Results are shown as fold increase related to NGM-derived matrix group of 3 individual experiments (* $p < 0,05$).

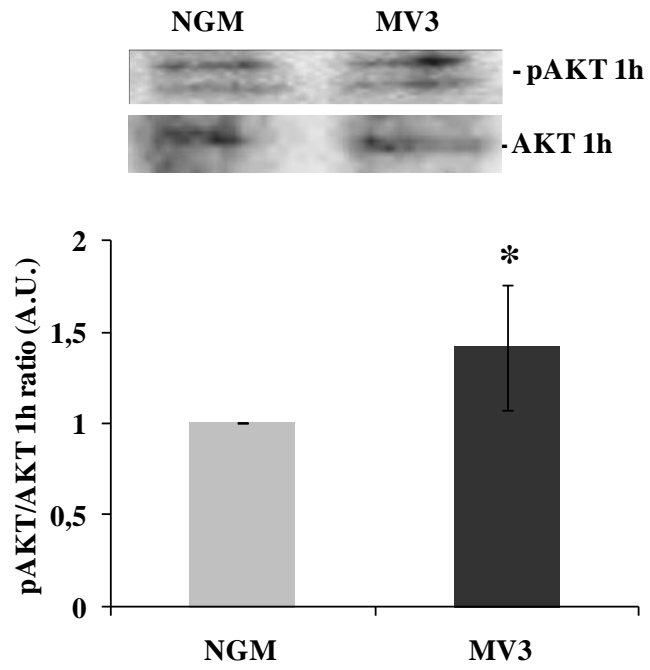
A



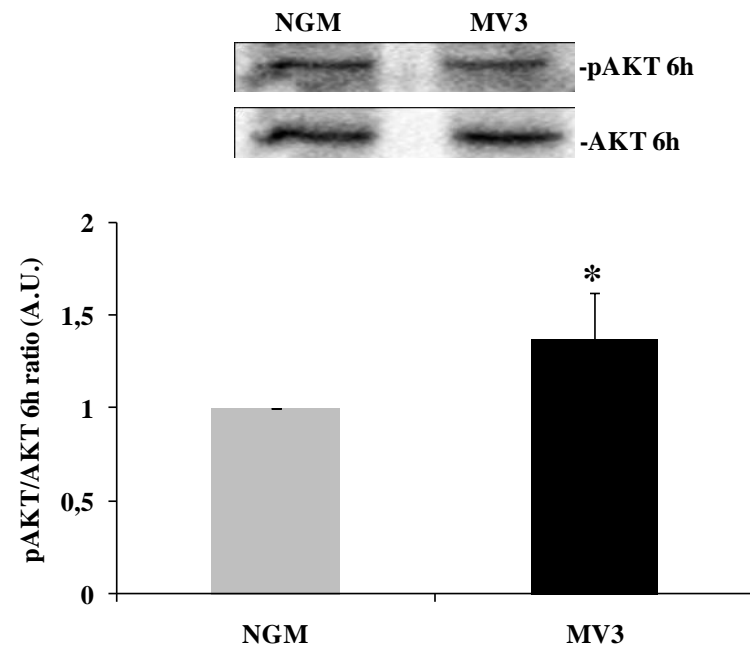
B



C



D



E

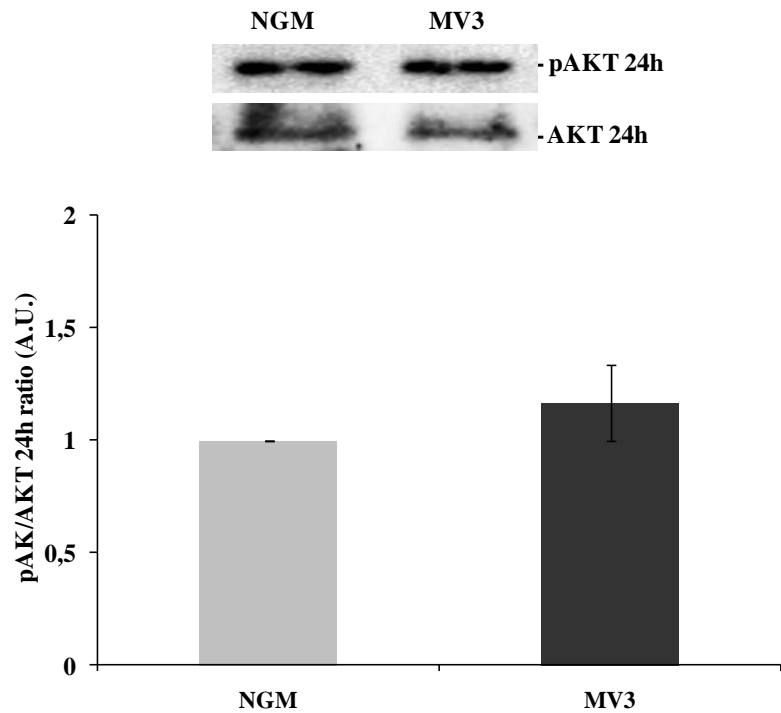
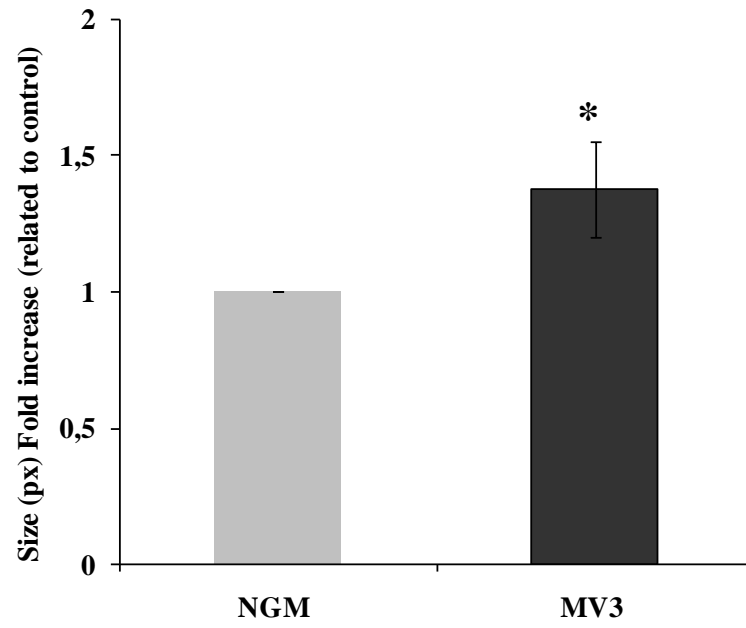
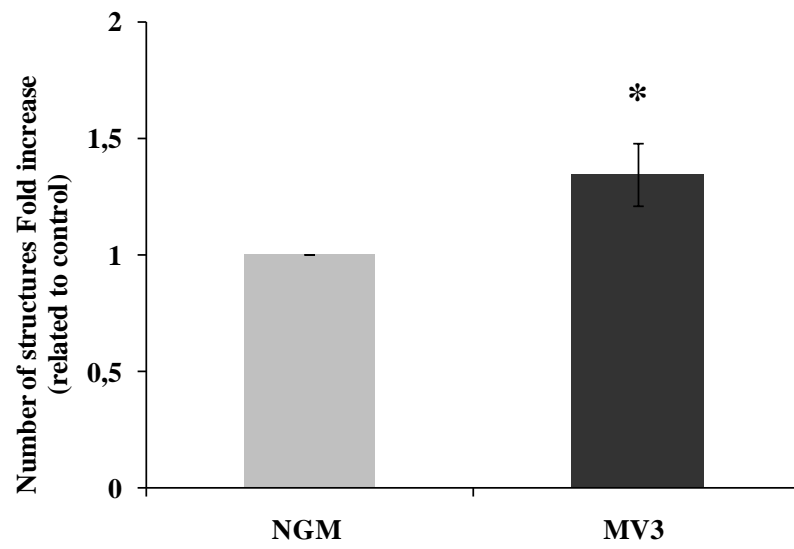


Figure 3. MV3 or NGM cells were grown during 72 hours. Cells were lysed and HMEC1 was seeded on each matrix for 1, 6 or 24 hours. Then, cells lysates were immunoblotted with (*A and B*) anti-pFAK^{tyr397} and with anti-FAK antibodies and (*C, D and E*) anti-pAKT and with anti-AKT antibodies. Western blot was quantified by densitometry. The results are representative from four different experiments. Results are shown as fold increase related to NGM-derived matrix group of 3 individual experiments.

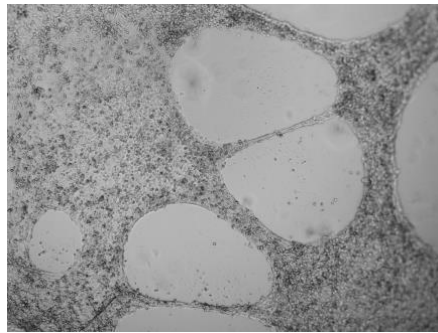
A



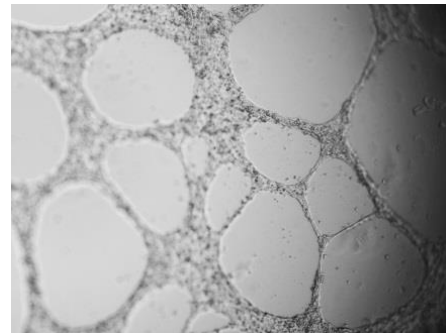
B



C



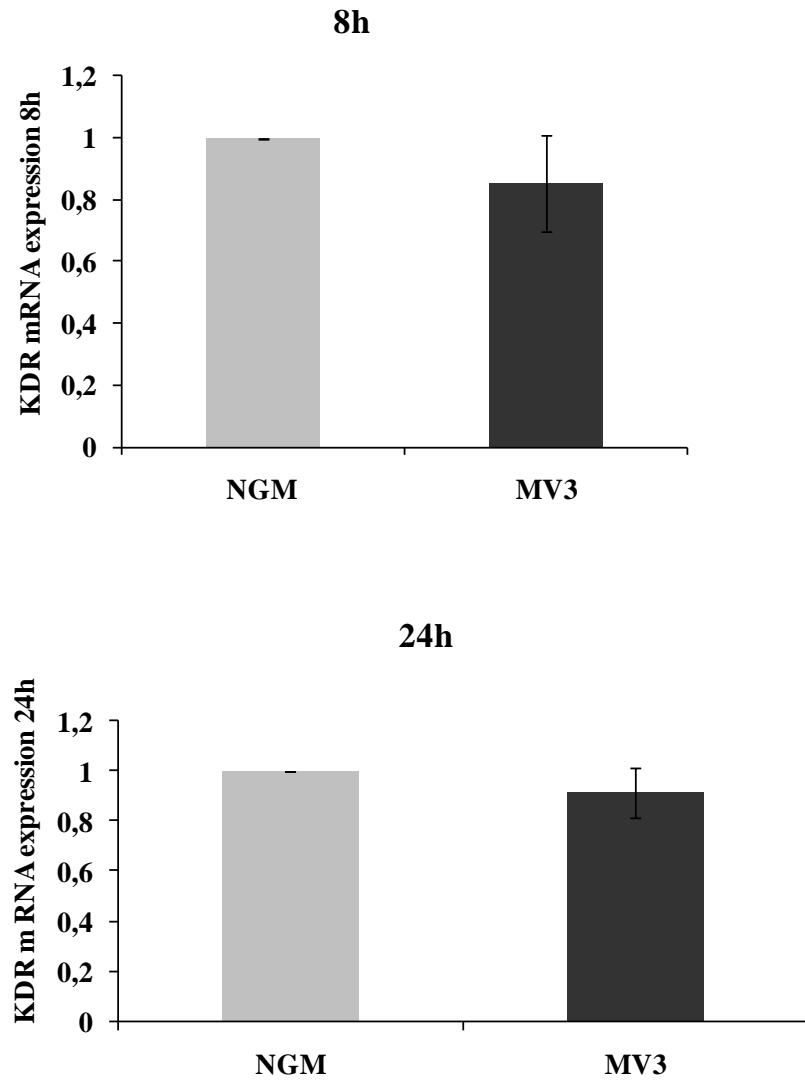
NGM



MV3

Figure 4. Basement membrane gels used for three-dimensional assays were formed by the polymerization of Matrigel (8.46 mg/ml) for 30 min at 37°C. MV3 and NGM cells were cultured on 6-well plates for 72h. Then, cells were extracted to obtain the extracellular matrix. HMEC1 were plated for 24 hours on these matrix. After, HMEC1 were trypsinized and seeded, on matrigel and incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂. Endothelial “sprouts” were quantified by counting 4 high-power fields (10x) in each condition, run in triplicate. (A) size of structure formed and (B) total number of structure formed. Results are shown as fold increase related to NGM-derived matrix group of 3 individual experiments (* p<0,05). (C) Representative figures.

A



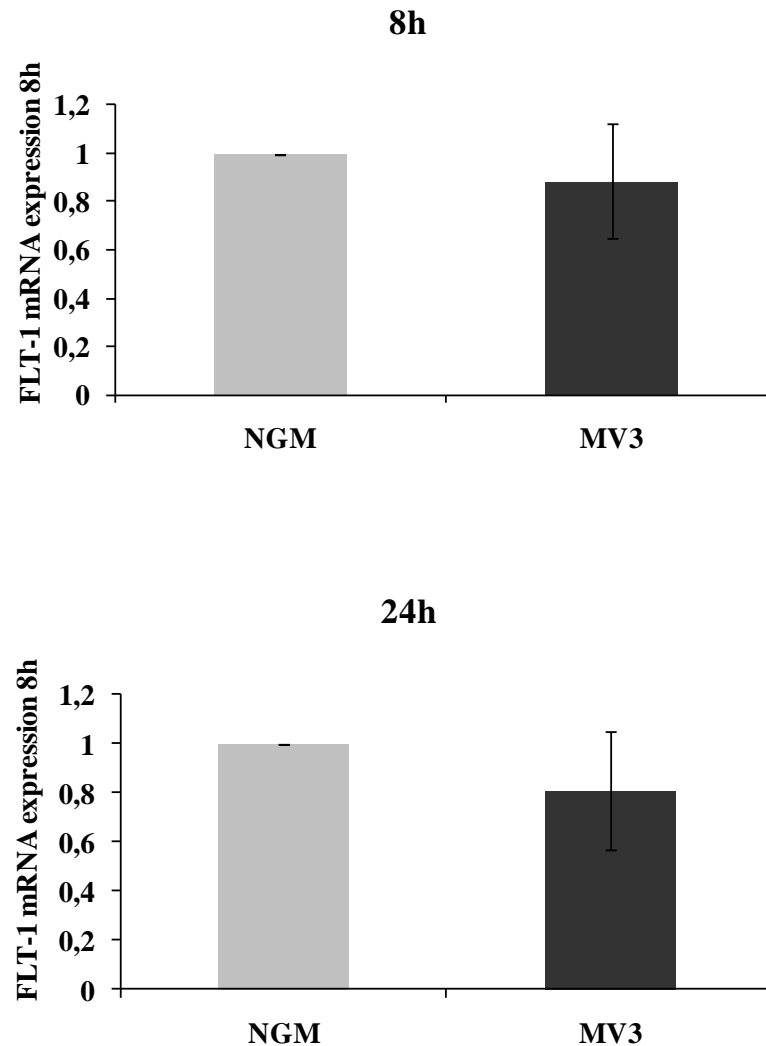
B

Figure 5. Total RNA from MV3 melanoma cells (5×10^5 cells HMEC1), NGM melanocyte (5×10^5 cells HMEC1) were isolated and, subsequently, the mRNA was reverse transcribed. Primers based on the sequence of Homo sapiens kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase) (KDR) (A), fms-related tyrosine kinase 1 (FLT1) (B) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were used and the quantitative real time PCR was performed in a Rotor gene Q using a SYBR-green fluorescence quantification system to quantify amplicons. The standard PCR conditions were 95° for 5 minutes, then 35 cycles at 95°C (5 s) and 60°C (10 s) followed by the standard denaturation curve.

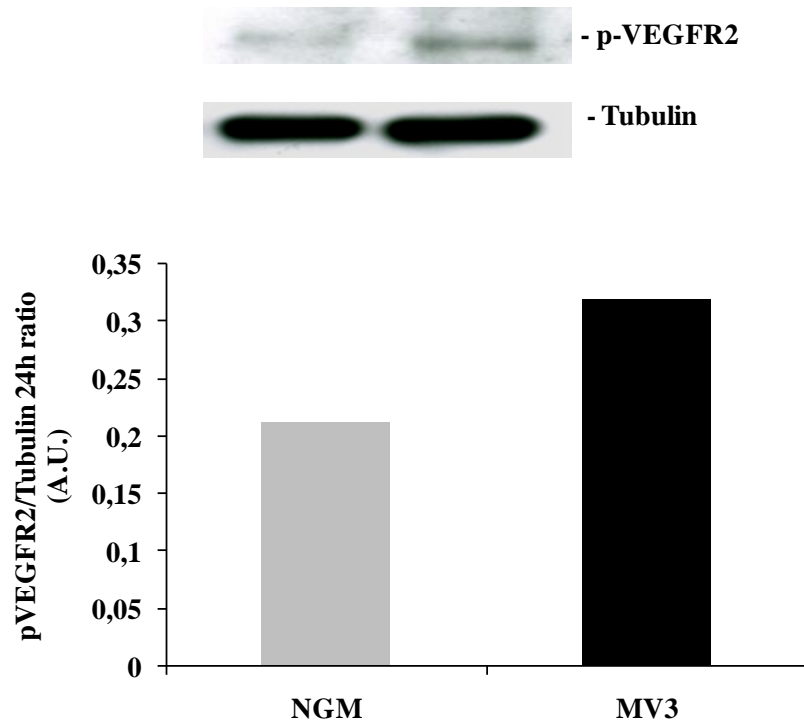


Figure 6. HUVECS (3×10^5) were seeded on MV3 or NGM-derived ECM for 24 hours in the presence of 10% FBS in a 6-well plate. Then, cells were let with medium M-199 0,1% of FBS for 6 hours and stimulated with VEGF (30ng/mL) for 10 minutes.

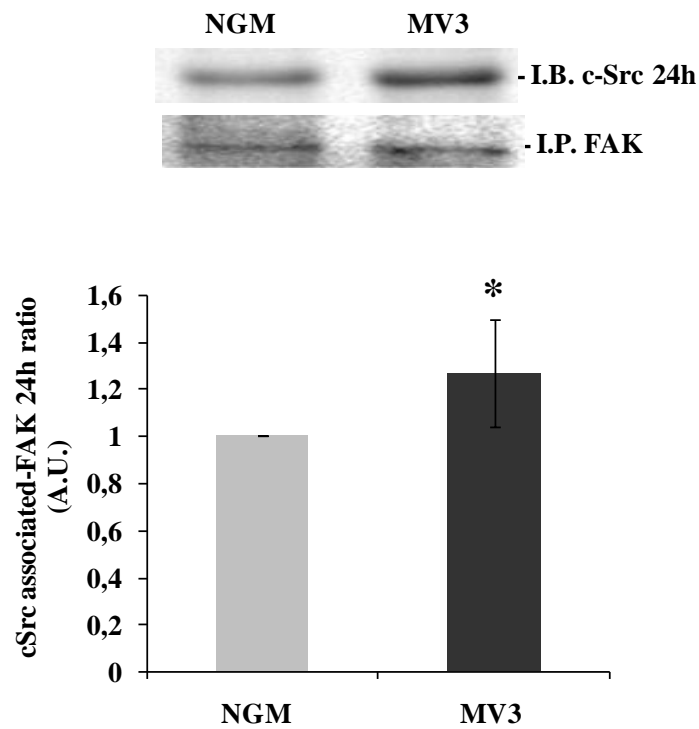


Figure 7. MV3 or NGM cells were grown during 72 hours. Cells were lysed and HMEC1 was seeded on each matrix for 24 hours. Then, cells lysates were immunoprecipitated with anti-FAK, and western blots were performed using an antibody specific for FAK detection. Blots were sequentially stripped and reprobed with anti-actin antibody. A representative blot is depicted (inset) for each experiment and the densitometry analysis, expressed in arbitrary units (AU) *P < 0.05.

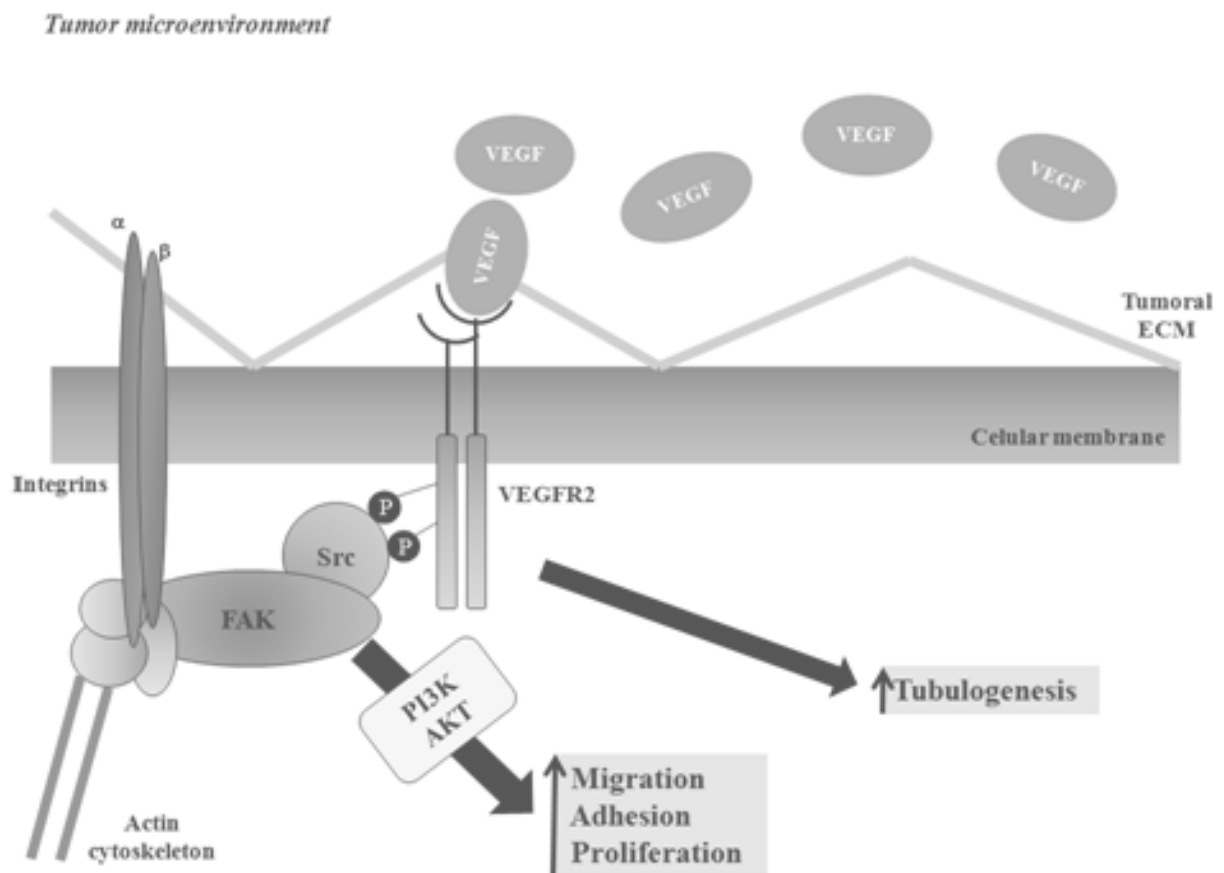
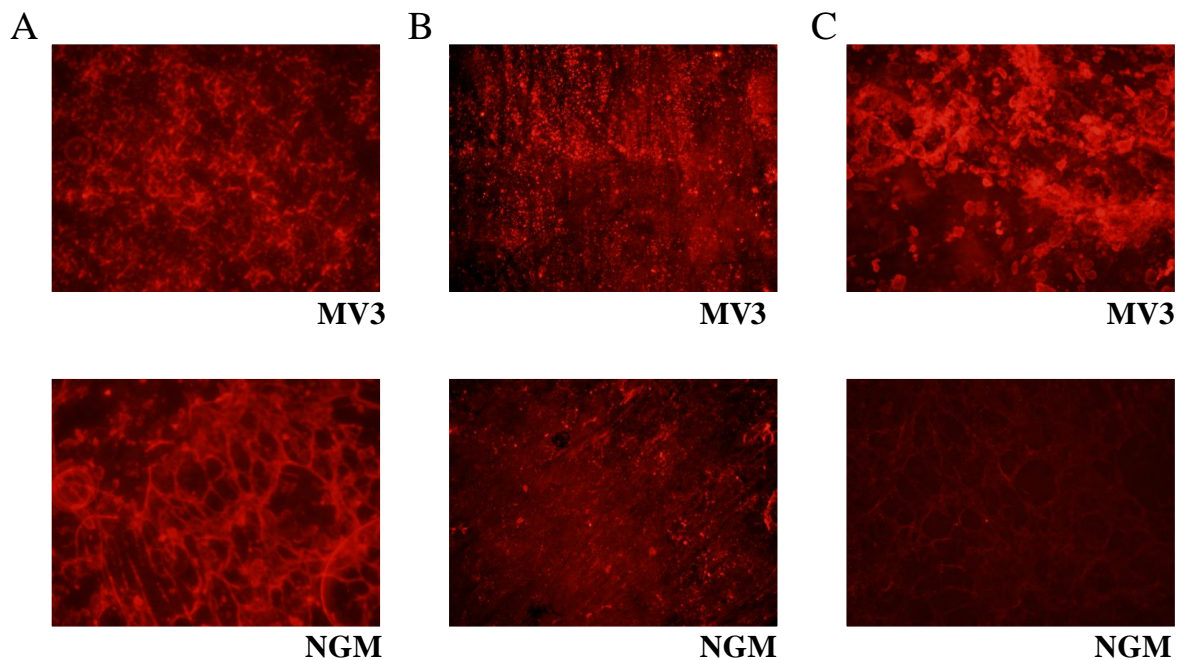


Figure 8. Conclusion: Tumor ECM activates integrins on endothelial cells surface, recruiting FAK and accessory proteins, promoting, on endothelial cell, reorganization on actin cytoskeleton, increasing stress fibers. FAK can also activate PI3K pathway on endothelial cells, which is responsible for increasing in migration, adhesion e proliferation. Finally, FAK can associate with Src, resulting in the phsphorylation of VEGF receptor 2, increasing the sensibility of this receptor to its ligand, resulting in increased of tubulogenesis.

*Supplementary data**Expression of laminin, tenascin-C and fibronectin in MV3 and NGM matrices.*

NGM and MV3 (1,5x10⁵ cells/mL) were allowed to adhere to the glass coverslips for 72h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Then, cells were fixed in a 4% paraformaldehyde / 4% sucrose / PBS solution for 20 min at room temperature, washed with PBS and blocked with 5% BSA in PBS overnight. Following the preparation, matrices were incubated with rabbit polyclonal anti-Laminin Ab or mouse monoclonal anti-tenascin and anti-fibronectin Ab (1:400) overnight at 4°C. Cells were washed and incubated with appropriate secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 555 (Invitrogen, Paisley, UK) at 4°C for 1 h. Coverslips were mounted on a slide using a solution of 20 mM N-propylgalate and 80% glycerol in PBS and examined under an Olympus IX71 microscope equipped for epifluorescence at 20x magnification (Coelho et al., 2004). In all immunostaining- negative controls, reactions were performed by omitting the primary antibody.



Supplementary figure 1. MV3 or NGM cells were grown in 24-well plates during 72 hours. Cells were lysed to obtain the extracellular matrix. The presence of fibronectin (A), tenascin-c (B) and laminin (C) were detected by immunofluorescence, using specific antibodies for each matrix protein.