



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Rafael Silveira Amêndola

**Papel do domínio desintegrina da ADAM9 na ativação e quimiotaxia de neutrófilos humanos**

Rio de Janeiro

2012

Rafael Silveira Amêndola

**Papel do domínio desintegrina da ADAM9 na ativação e quimiotaxia de neutrófilos humanos**

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.<sup>a</sup> Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo

Rio de janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

A511 Amêndola, Rafael Silveira.  
Papel do domínio desintegrina da ADAM9 na ativação e quimiotaxia de neutrófilos humanos / Rafael Silveira Amêndola. – 2012.  
77 f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Integrinas. 2. Proteínas ADAM. 3. Neutrófilos - Teses. 4. Células – Migração – Teses. 5. Quimiotaxia – Teses. I. Barja-Fidalgo, Thereza Christina. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 576.3

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

---

Assinatura

---

Data

Rafael Silveira Amêndola

**Papel do domínio desintegrina da ADAM9 na ativação e quimiotaxia de neutrófilos humanos**

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 27 de fevereiro de 2012.

Orientadora:

Prof<sup>a</sup>. Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Rodolpho Mattos Albano  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Samuel dos Santos Valença  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha  
Universidade de São Paulo

Rio de Janeiro

2012

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thereza Christina Barja-Fidalgo por ter me dado a oportunidade de trabalhar e desenvolver este projeto em seu laboratório, além de toda a paciência e atenção.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Iolanda M. Fierro pela sinceridade e pelos "puxões de orelha" que ajudaram no meu crescimento profissional.

Ao Heitor e à Roberta que foram como pais para mim no laboratório e deram uma valorosa contribuição para minha formação profissional. Devo tudo a vocês, uma pena não estarem presentes em mais uma etapa importante da minha vida.

Ao Edward pela amizade e principalmente por aceitar em ser o revisor da minha dissertação.

Aos amigos do laboratório, Rafael, Pedro, João, Yan, Edward, Mariana, Carol, Simone, Cristiane, Guta, Amanda, Andreza, Gabi, Renata, Genilson, Renatinha, Fernanda, Natália, André, Antônio e Davi pelos momentos de descontração que me ajudaram a esquecer os meus problemas.

Aos técnicos do laboratório, Renata e Genilson, que são indispensáveis para o bom andamento dos experimentos.

Às minhas amigas, Érika e Anna, pela amizade e pelo companheirismo durante os anos de faculdade.

À minha mãe, Cristina, por ter me mostrado o caminho a ser seguido e por ter se tornado a luz que me guia. Você me criou com todo seu amor e carinho. E me deixou como herança a sua personalidade, seus princípios e seu forte senso de justiça. Tenho certeza de que onde estiver, estará sempre zelando por mim. Obrigado por tudo.

Ao meu irmão, Rodrigo, por ter me ajudado nos momentos de maior dificuldade e por ser um exemplo de perseverança, pois jamais desistiu de alcançar seus objetivos e sempre contornou os obstáculos que a vida nos impõe.

Ao meu pai pelo carinho e dedicação mesmo em meio as nossas desavenças e discussões.

A todos da minha família que estiveram presentes em muitos momentos importantes da minha vida.

Viva de maneira que sua presença não seja notada, mas  
que sua ausência seja sentida.

*Leonardo da Vinci*

## RESUMO

AMENDOLA, Rafael Silveira. *Papel do domínio desintegrina da ADAM9 na ativação e quimiotaxia de neutrófilos humanos*. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

As ADAM compreendem uma família de proteínas transmembrana ou secretadas envolvidas em importantes processos fisiológicos como proteólise e adesão celular. Por outro lado, muitas ADAM exercem um papel central na formação e progressão de diversas patologias. O aumento da expressão de ADAM9 está correlacionada com o desenvolvimento de tumores devido a atividade proteolítica mediada pelo domínio metaloprotease. Embora muitos estudos abordem a atividade proteolítica dos membros desta família, o papel do domínio tipo desintegrina permanece desconhecido. O presente estudo visa investigar os efeitos da ADAM9D sobre a ativação e quimiotaxia de neutrófilos humanos. Para isso, utilizamos um modelo experimental no qual neutrófilos humanos isolados do sangue periférico foram estimulados *in vitro* para melhor entender os mecanismos ativados pela ADAM9D no processo migratório. ADAM9D foi capaz de promover o recrutamento de neutrófilos, além de torná-los menos responsivos a estímulos quimiotáticos clássicos como fMLP, IL-8 e LTB<sub>4</sub>. Este efeito parece depender da expressão das integrinas  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_9\beta_1$  e  $\alpha_v\beta_3$ , uma vez que, o tratamento das células com anticorpos bloqueadores inibiu a migração em resposta a ADAM9D. Em adição, o tratamento de neutrófilos com um inibidor de proteína G (toxina pertussis) ou inibidores de CXCR2 (SB225002 e repertaxina) também inibiu a resposta migratória. Tomados em conjunto, nossos dados sugerem que a ADAM9D induz a migração de neutrófilos através da via da PI3K/Akt. Além disso, o efeito quimiotático da ADAM9D parece depender da ativação de CXCR2, sugerindo um possível mecanismo de transativação presente neste fenômeno.

Palavras-chave: Neutrófilos. Migração. Integrinas. ADAM9D.

## ABSTRACT

AMENDOLA, Rafael Silveira. *Role of the disintegrin domain of ADAM9 in the activation and chemotaxis of human neutrophils*. 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

ADAM comprise a family of secreted and transmembrane proteins involved in important physiological process such as cell adhesion and proteolysis. On the other hand, multiple ADAM play a central role in the formation and progression of various diseases. The increased expression of ADAM9 is correlated with tumor development due to proteolytic activity mediated by metalloprotease domain. Although many studies address the proteolytic activity of members of this family, the role of the disintegrin-like domain remains unknown. The present study aims to investigate the effects of ADAM9D on the activation and chemotaxis of human neutrophils. We used an experimental model in which human neutrophils isolated from peripheral blood were stimulated in vitro to better understand the mechanisms by ADAM9D in the migration process. ADAM9D was able to promote neutrophil recruitment, and make them less responsive to classical chemotactic stimuli such as fMLP, IL-8 and LTB<sub>4</sub>. This effect seems to depend on expression of  $\alpha 5\beta 1$  integrin,  $\alpha v\beta 3$  and  $\alpha 9\beta 1$ , since treatment of the cells with blocking antibodies inhibited migration in response to ADAM9D. Additionally, the treatment of neutrophil with an inhibitory G protein (pertussis toxin) or inhibitors of CXCR2 (SB225002 and repertaxina) also inhibited the migratory response. Taken together, our data suggest that ADAM9D induces migration of neutrophils through the PI3K/Akt pathway. In addition, the chemotactic effect seems to depend on the ADAM9D CXCR2 activation, suggesting a possible mechanism of transactivation present in this phenomenon.

Keywords: Neutrophils. Migration. Integrins. ADAM9D.



## LISTA DE FIGURAS

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Figura 1 -  | Etapas da resposta inflamatória.....   | 15 |
| Figura 2 -  | Processos de migração e fagocitose em leucócitos.....  | 17 |
| Figura 3 -  | Atividade fagocítica e microbicida de neutrófilos.....   | 20 |
| Figura 4 -  | Representação esquemática da estrutura das integrinas.....   | 23 |
| Figura 5 -  | Estados conformacionais das integrinas.....  | 27 |
| Figura 6 -  | Sinalização mediada por integrinas.....  | 29 |
| Figura 7 -  | Estrutura das proteínas pertencentes à família ADAM.....   | 32 |
| Figura 8 -  | Processamento de proteínas transmembrana.....  | 35 |
| Figura 9 -  | Purificação de neutrófilos humanos através de gradiente descontínuo de Percoll.....  | 47 |
| Figura 10 - | Desenho esquemático da câmara de Boyden modificada.....  | 47 |
| Figura 11 - | Efeito da ADAM9D sobre a migração de neutrófilos humanos.....  | 49 |
| Figura 12 - | Efeito da ADAM9D sobre a produção de EROs em neutrófilos humanos.....  | 50 |
| Figura 13 - | Efeito da inibição da apoptose de neutrófilos humanos estimulados com ADAM9D.....  | 52 |
| Figura 14 - | Envolvimento das integrinas $\alpha_5\beta_1$ , $\alpha_9\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ na migração de neutrófilos humanos induzida pela ADAM9D..... | 53 |
| Figura 15 - | Participação da via da PI3K na migração de neutrófilos humanos em resposta a ADAM9D.....   | 56 |
| Figura 16 - | O efeito quimiotático induzido pela ADAM9D depende da ativação de CXCR2.....   | 57 |
| Figura 17 - | Efeito do pré-tratamento de neutrófilos humanos com inibidor de CXCR2 sobre a ativação da via PI3K/Akt.....  | 58 |
| Figura 18 - | Efeito da inibição da apoptose de neutrófilos humanos estimulados com ADAM-9D depende da ativação de CXCR2.....                                    | 59 |

## LISTA DE TABELAS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Tabela 1 - | Classificação de integrinas de acordo com a subunidade $\beta$ ..... | 26 |
| Tabela 2 - | Alguns membros da família ADAM.....                                  | 34 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| ADAM                          | Proteína com domínios metaloprotease e desintegra         |
| ADAMTs                        | ADAM com resíduos de trombospondina                       |
| BSA                           | Albumina sérica bovina                                    |
| CXCR2                         | Receptor 2 para IL-8                                      |
| DAG                           | Diacilglicerol  |
| DISC                          | Complexo de sinalização e indução de morte                |
| ECD                           | Ácido glutâmico-glicina-ácido aspártico                   |
| ECL                           | Quimiluminescência ampliada                               |
| EGF                           | Fator de crescimento epidermal                            |
| ERK                           | Quinase regulada por estímulo extracelular                |
| ERO                           | Espécies reativas de oxigênio                             |
| FACS                          | Citometria de fluxo                                       |
| FADD                          | Domínio de morte associado a Fas                          |
| FAK                           | Quinase de adesão focal                                   |
| FITC                          | Isotiocianeto fluoresceína                                |
| fMLP                          | N-formil-metionil-fenilalanina                            |
| G-CSF                         | Fator estimulador de colônia de granulócitos              |
| GM-CSF                        | Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos |
| GPCR                          | Receptor acoplado a proteína G                            |
| GRK                           | Quinase GPCR  |
| GTPases                       | Guanosina trifosfatase                                    |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrogênio                                    |
| ICAM                          | Molécula de adesão intracelular                           |
| IgG                           | Imunoglobulina G  |
| IL-8                          | Interleucina 8  |
| IP <sub>3</sub>               | Inositol 1,4,5 trifosfato                                 |
| JNK                           | Quinase N-terminal un                                     |
| KHCO <sub>3</sub>             | Bicarbonato de potássio                                   |

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| LTB <sub>4</sub>            | Leucotrieno B <sub>4</sub>                       |
| MAPK                        | Proteína quinase ativada por mitógeno            |
| MEC                         | Matriz extracelular                              |
| MPO                         | Mieloperoxidase                                  |
| NADPH                       | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato       |
| NF-κB                       | Fator nuclear kappa B                            |
| NH <sub>4</sub> Cl          | Cloreto de amônia                                |
| NO                          | Óxido nítrico                                    |
| NOD                         | Domínio de ligação de nucleotídeo e oligomeração |
| NOS                         | Óxido nítrico sintase                            |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup> | Ânion superóxido                                 |
| PAF                         | Fator ativador de plaquetas                      |
| PBS                         | Tampão fosfato de sódio                          |
| PI3K                        | Fosfatidil inositol-3 quinase                    |
| PIP <sub>2</sub>            | Fosfatidil inositol-4,5-bifosfato                |
| PLC                         | Fosfolipase C                                    |
| PMA                         | Forbol 12-miristato 13-acetato                   |
| PVDF                        | Polivinilideno difluorido                        |
| RGD                         | Arginina-glicina-ácido aspártico                 |
| RIG                         | Gene induzido por ácido retinóico                |
| RTK                         | Receptor com atividade tirosina quinase          |
| SDS                         | Dodecilssulfato de sódio                         |
| SDS-PAGE                    | Eletroforese em gel de poliacrilamida            |
| SVMP                        | Metaloprotease de veneno de serpentes            |
| TACE                        | Enzima conversora de TNF- α                      |
| TGF                         | Fator de crescimento transformante               |
| TLR                         | Receptores tipo Toll                             |
| TNF-α                       | Fator de necrose tumoral α                       |
| T-PBS                       | Tampão fosfato de sódio Tween                    |
| VCAM                        | Molécula de adesão celular vascular              |
| VEGF                        | Fator de crescimento do endotélio vascular       |

## SUMÁRIO

|     |   |    |
|-----|---|----|
|     | <b>INTRODUÇÃO.....</b>  | 13 |
| 1   | <b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>   | 13 |
| 1.1 | <b>Inflamação e migração celular.....</b>   | 13 |
| 1.2 | <b>Integrinas e sinalização celular.....</b>  | 22 |
| 1.3 | <b>A família de proteínas ADAM.....</b>   | 30 |
| 1.4 | <b>ADAM9 e progressão tumoral.....</b>  | 36 |
| 2   | <b>OBJETIVOS.....</b>   | 40 |
| 2.1 | <b>Objetivo geral.....</b>  | 40 |
| 2.2 | <b>Objetivos específicos.....</b>   | 40 |
| 3   | <b>METODOLOGIA.....</b>   | 41 |
| 3.1 | <b>Reagentes.....</b>   | 41 |
| 3.2 | <b>Isolamento de neutrófilos.....</b>   | 41 |
| 3.3 | <b>Contagem e tratamento das células.....</b>   | 42 |
| 3.4 | <b>Quimiotaxia em câmara de Boyden.....</b>   | 42 |
| 3.5 | <b>Análise da produção de ERO através da reação com luminol.....</b>  | 43 |
| 3.6 | <b>Análise da apoptose de neutrófilos por citometria de fluxo.....</b>  | 43 |
| 3.7 | <b>Determinação do potencial da membrana mitocondrial (<math>\Delta\psi_m</math>) por<br/>citometria de fluxo.....</b>                      | 44 |
| 3.8 | <b>Eletroforese e Westernblotting.....</b>  | 45 |
| 3.9 | <b>Tratamento estatístico.....</b>  | 46 |
| 4   | <b>RESULTADOS.....</b>  | 48 |
| 4.1 | <b>Efeito da ADAM9D sobre a resposta quimiotática de neutrófilos<br/>humanos.....</b>   | 48 |
| 4.2 | <b>Efeito da ADAM9D sobre a produção de EROs em neutrófilos<br/>humanos.....</b>  | 48 |
| 4.3 | <b>Efeito da inibição da apoptose de neutrófilos humanos estimulados<br/>com ADAM9D.....</b>  | 51 |
| 4.4 | <b>Envolvimento das integrinas <math>\alpha_5\beta_1</math>, <math>\alpha_9\beta_1</math> e <math>\alpha_v\beta_3</math> na migração de</b> |    |

|     |  |           |
|-----|--|-----------|
|     | <b>neutrófilos humanos induzida pela ADAM-9D.....</b>  | <b>51</b> |
| 4.5 | <b>Participação da via da PI3K na migração de neutrófilos humanos em resposta a ADAM9D.....</b>                        | <b>54</b> |
| 4.6 | <b>O efeito quimiotático da ADAM9D depende da ativação de CXCR2....</b>  | <b>54</b> |
| 4.7 | <b>Efeito da inibição da apoptose de neutrófilos humanos estimulados com ADAM-9D depende da ativação de CXCR2.....</b> | <b>55</b> |
| 5   | <b>DISCUSSÃO.....</b>  | <b>55</b> |
|     | <b>CONCLUSÃO.....</b>  | <b>66</b> |
|     | <b>REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>67</b> |

## INTRODUÇÃO

Os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa do organismo contra agentes invasores. Estas células migram da corrente sanguínea para o tecido em resposta a estímulos produzidos localmente que sinalizam a presença de agentes invasores (Paula-Neto e col., 2010). O processo de migração é, em parte, mediado por integrinas que aumentam a sobrevivência dos neutrófilos e permitem que estas células cheguem ao foco inflamatório (Saldanha-Gama e col., 2010). As integrinas expressas pelos neutrófilos são capazes de interagir com determinadas ADAMs, como a ADAM-12 e ADAM-15, as quais são encontradas super expressas em células tumorais (Lafuste e col., 2005).

As ADAMs participam de importantes processos celulares que incluem proteólise, adesão, sinalização celular, entre outros (Edwards e col., 2008). Por outro lado, a expressão exacerbada destas proteínas está associada ao desenvolvimento e progressão de diversas patologias como artrite reumatóide, asma, doenças cardiovasculares, Alzheimer e câncer, sendo esta última amplamente estudada (Duffy e col., 2003).

As células tumorais, atualmente, são o grande objeto de estudo da pesquisa por serem capazes de utilizar as diversas maquinarias do organismo hospedeiro em benefício próprio. A proliferação descontrolada, a invasão e a metástase são as principais características da progressão do câncer. Estudos utilizando diferentes linhagens tumorais demonstraram que determinadas ADAMs, particularmente a ADAM9, exercem um papel importante na formação e progressão de tumores (Duffy e col., 2009).

Embora existam evidências do papel proteolítico promovido pelo domínio metaloprotease das proteínas ADAMs, as funções desempenhadas pelo domínio desintegrina e as vias de sinalização ativadas por elas ainda são pouco exploradas.

# 1 REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 Inflamação e migração celular

A inflamação é uma resposta fisiológica complexa desencadeada nos tecidos vascularizados em resposta a estímulos produzidos no local da injúria e visa eliminar os agentes causadores da lesão, contribuindo para a homeostase tecidual (Rock e Kono, 2008). O processo inflamatório abrange uma série de eventos celulares e vasculares induzidos por estímulos endógenos ou exógenos de natureza química, física ou biológica.

Os cinco sinais clássicos da inflamação, calor, rubor, edema, dor e perda de função são conseqüências dos efeitos biológicos de mediadores produzidos no local da lesão (Bannenberg e col., 2007). Estes mediadores promovem aumento do fluxo sanguíneo local (calor e rubor), aumento da permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos (edema) e liberação de agentes indutores de algesia (dor). A resposta inflamatória está intimamente ligada ao processo de reparação do tecido lesado, o qual se inicia nas primeiras fases da inflamação e completa-se quando o agente causador da lesão é neutralizado (Borissoff e col., 2008; Levi e Poll, 2005).

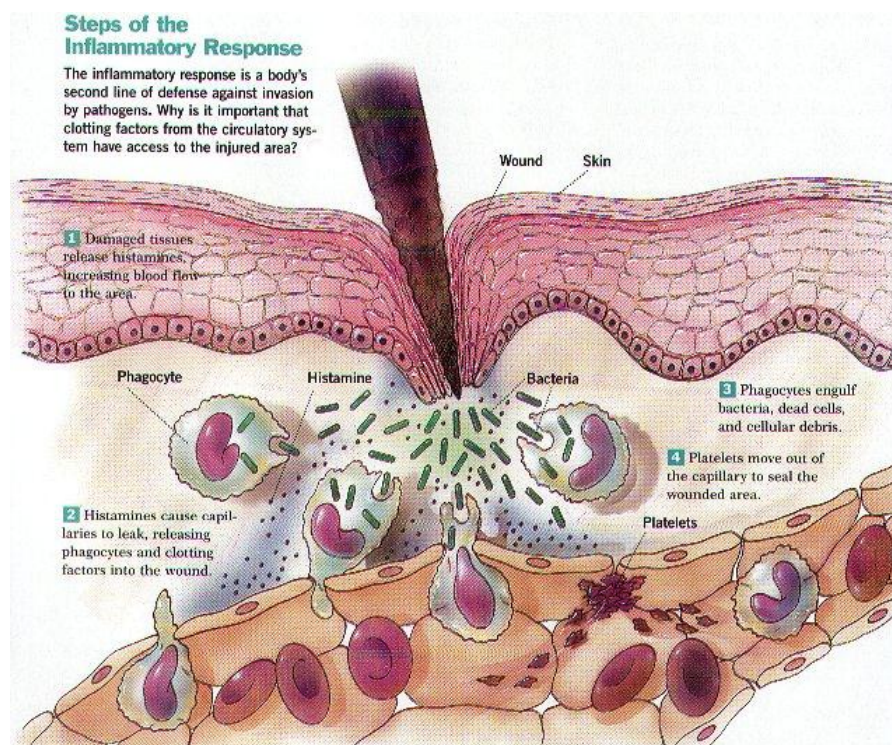
Durante as etapas iniciais da resposta inflamatória, microorganismos invasores são reconhecidos por células do hospedeiro que, em resposta, produzem uma série de mediadores inflamatórios responsáveis pelo recrutamento de leucócitos da corrente sanguínea para o tecido lesionado (Figura 1). O reconhecimento de microorganismos pelas células do hospedeiro depende da expressão de uma família de receptores capaz de reconhecer componentes estruturais essenciais à biologia dos microorganismos, os receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLRs). Estes receptores são encontrados em diferentes tipos celulares como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células epiteliais de mucosas e células endoteliais (Beutler, 2009).

Atualmente, treze TLRs foram identificados em mamíferos, sendo dez em humanos. Esta variedade de receptores permite que as células do organismo reconheçam diferentes componentes moleculares de microorganismos (Hurst e von Landenberg, 2008). Estudos mais recentes levaram a descrição de outra classe de receptores intracelulares que, assim como os TLRs, reconhecem os componentes microbianos. Os receptores com domínio de ligação de nucleotídeo e oligomeração (*nucleotide-binding oligomerization domain*, NOD), e o gene 1



induzido por ácido retinóico (*retinoic acid-induced gene 1*, RIG-1) são os principais representantes desta classe de receptores (Beutler, 2009). Juntos, estes diferentes receptores são essenciais para a construção de uma resposta imunológica adequada. A sinalização via TLRs culmina com a ativação de uma série de fatores de transcrição, particularmente o fator nuclear kappa B (*nuclear factor kappa B*, NF- $\kappa$ B), levando a expressão e supressão de um grande número de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias (Beutler, 2009). A produção destes mediadores inflamatórios por células residentes promove a ativação do endotélio, aumento da permeabilidade vascular e inicia o processo de influxo de leucócitos circulantes para o tecido. A ativação do endotélio pelos mediadores inflamatórios causa alterações na morfologia celular e na expressão de moléculas de adesão que resultam com a adesão e o extravasamento de leucócitos para o tecido (Vandenbroucke e col., 2008).

Figura 1 - Etapas da resposta inflamatória



Legenda: Células residentes do hospedeiro reconhecem microrganismos invasores, representados no esquema pelas bactérias. Em resposta a este reconhecimento, as células residentes produzem mediadores pró-inflamatórios que recrutarão os leucócitos presentes na corrente sanguínea para o local lesionado. No tecido, os leucócitos fagocitam e eliminam as bactérias, restaurando a homeostase tecidual.

Fonte: [www.goodpsych.com/storage/inflammation.jpg](http://www.goodpsych.com/storage/inflammation.jpg).

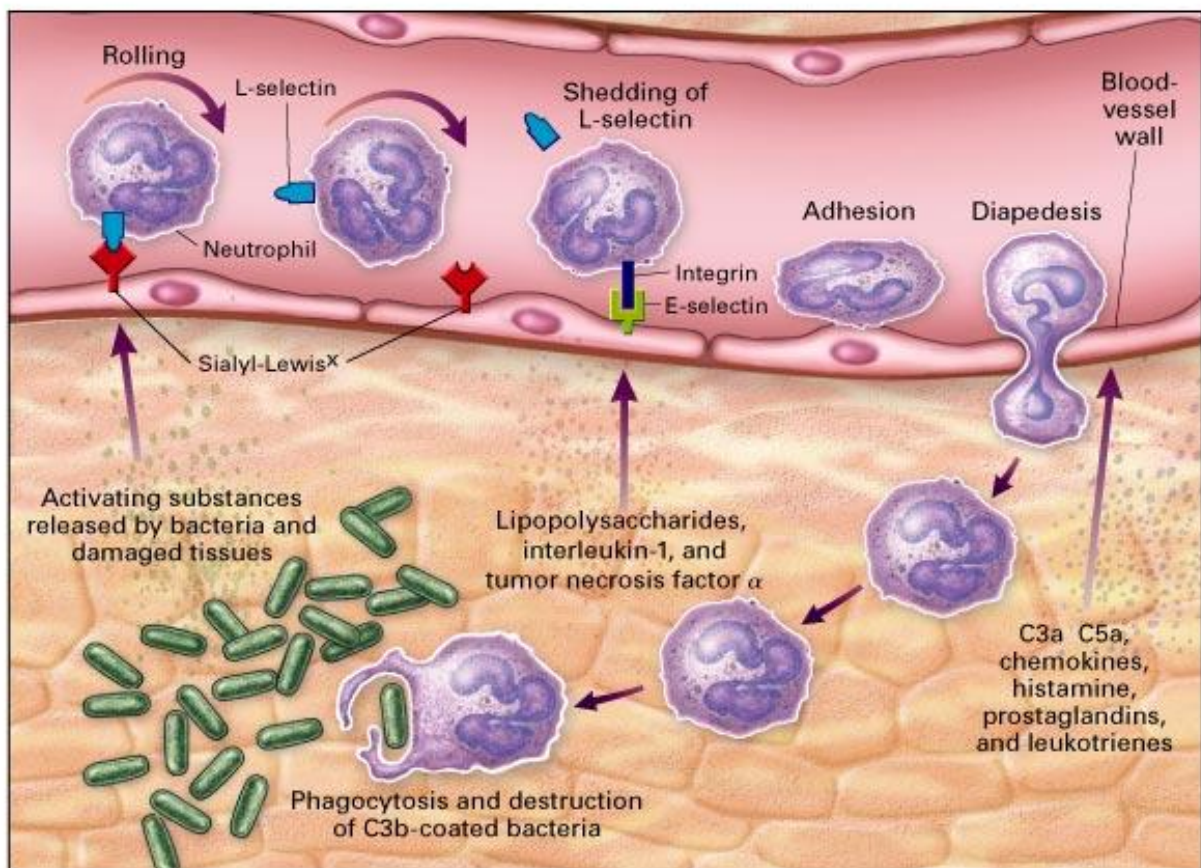
Os eventos que levam ao recrutamento de leucócitos circulantes para o tecido lesionado encontram-se divididos em diferentes etapas altamente coordenadas, envolvendo interações célula-célula moduladas por uma diversidade de mediadores inflamatórios e moléculas de adesão. Inicialmente, os leucócitos da corrente sanguínea se deslocam do centro da circulação para a periferia do vaso, devido ao aumento da permeabilidade vascular e a conseqüente redução da velocidade do fluxo sanguíneo (Schmid-Schönbein, 2006). Este processo denominado marginação é influenciado por alterações nas condições hemodinâmicas do fluxo sanguíneo. O contato célula-célula leva a uma diminuição da velocidade de deslocamento dos leucócitos como resultado de interações fracas entre moléculas de adesão do tipo selectinas expressas em leucócitos e seus ligantes presentes nas células endoteliais (Thelen e Stein, 2008). Estas interações induzem vias de sinalização intracelulares que resultam na ativação de integrinas, expressas normalmente no estado inativo pelas células imunológicas. Ao serem ativadas, as integrinas promovem a adesão firme dos leucócitos ao endotélio. Após a adesão, os leucócitos inserem pseudópodos em junções existentes entre as células endoteliais (Schmid-Schönbein, 2006). Desta forma, os leucócitos conseguem atravessar a camada endotelial e migrar para o foco inflamatório, caracterizando o processo de transmigração (Figura 2).

O rolamento é mediado por moléculas de adesão da família das glicoproteínas de superfície, as selectinas que incluem a E-selectina (expressa em células endoteliais), a L-selectina (expressa em leucócitos), a P-selectina (expressa em plaquetas e células endoteliais), e seus ligantes. Já os processos de adesão e transmigração são mediados por integrinas expressas pelos leucócitos e também pelo endotélio e por membros da superfamília de imunoglobulinas (Ig) expressas pelas células endoteliais (Alves-Filho e col., 2008). Dentre as integrinas mais importantes, destacam-se as famílias da integrina  $\beta_2$  e da integrina  $\beta_1$ . Após a ativação de leucócitos via receptores quimiotáticos, as integrinas interagem com os membros da superfamília de imunoglobulinas presentes na membrana de células endoteliais, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) (Alves-Filho e col., 2008).

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na corrente sanguínea e, portanto, são as primeiras células a serem recrutados para o foco inflamatório. Em outras palavras, os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa do organismo contra agentes invasores (Cowburn e col., 2008). Estas células migram da corrente sanguínea para o tecido em resposta a estímulos produzidos localmente que sinalizam a presença de agentes invasores. Nos

tecidos, os neutrófilos fagocitam e eliminam estes agentes, contribuindo para a homeostase tecidual (Figura 2). Estudos recentes demonstraram que os neutrófilos liberam importantes componentes que induzem o recrutamento de monócitos para o local da injúria, potencializando a resposta imunológica (Soehnlein e col., 2008). Além disso, existem evidências de que os neutrófilos, assim como apresentadores de antígenos profissionais, são capazes de processar e apresentar antígenos às células da imunidade adaptativa, sendo indispensáveis para a construção de uma resposta imunológica eficiente (Abadie e col., 2005).

Figura 2 - Processo de migração e fagocitose em leucócitos



Legenda: O extravasamento de leucócitos para o foco inflamatório em resposta a diferentes estímulos depende da interação entre os leucócitos e as células endoteliais através de moléculas de adesão, de maneira coordenada, promovendo o rolamento, a adesão firme e a migração transendotelial dos leucócitos. Uma vez no tecido, os leucócitos fagocitam e eliminam os microrganismos.

Fonte: Delves e Roitt, 2000, f. 43.

Os neutrófilos originam-se de células pluripotentes da medula óssea sob a influência de vários fatores de crescimento, tais como os fatores estimuladores de colônia de granulócitos (*granulocyte-colony stimulated factor*, G-CSF) e os fatores estimuladores de colônia de granulócitos e macrófagos (*granulocyte end macrophage-colony stimulated factor*, GM-CSF). Estes fatores exercem seus efeitos na diferenciação e maturação de leucócitos, bem como na modulação da atividade de granulócitos maduros (Kennedy e DeLeo, 2009). A diferenciação de granulócitos ocorre através de uma série de etapas coordenadas que vão desde a formação dos grânulos até a saída de neutrófilos maduros da medula óssea para a corrente sanguínea. Embora os neutrófilos tenham uma meia-vida relativamente curta na circulação sanguínea (entre 24 e 36 horas), grande parte da hematopoiese (cerca de 60%) é voltada para a produção de neutrófilos (Kennedy e DeLeo, 2009), destacando a importância destas células para o sistema imunológico.

A migração de neutrófilos é um processo fisiopatológico importante, pois permite que estas células alcancem o foco inflamatório e eliminem os microrganismos invasores. A presença de um gradiente químico, constituído por mediadores derivados do próprio organismo ou de origem exógena, promove a saída dos neutrófilos da corrente sanguínea para o local lesionado, caracterizando o processo de quimiotaxia. Os agentes quimiotáticos podem se diferenciar quanto à natureza química - podem ser protéicos, como as quimiocinas interleucina (IL)-8 e fragmentos do sistema complemento, ou lipídicos como o leucotrieno (LT) B<sub>4</sub> e o fator ativador de plaquetas (*platelet activating factor*, PAF) - e no modo de produção - podem ser endógenos, como os fatores descritos anteriormente, ou podem derivar dos microrganismos invasores, como o peptídeo N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) (Van Haastert e Devrotes, 2004). O reconhecimento dos diferentes agentes quimiotáticos requer a expressão de uma importante família de receptores transmembrana na superfície dos neutrófilos, os receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Estes receptores sinalizam via proteína G, uma proteína heterotrimérica constituída pelas subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (Pierce e col., 2002). A ligação dos mediadores ao receptor promove o desacoplamento entre a subunidade  $\alpha$  e o complexo  $\beta\gamma$ , resultando na propagação de sinais desencadeados por estas subunidades que induzem, por exemplo, a ativação da via de sinalização fosfatidil inositol-3 quinase (PI3K) e a ativação da enzima fosfolipase C (*phospholipase C*, PLC) (Pierce e col., 2002). Estes diferentes mecanismos levam ao aumento de cálcio intracelular e a ativação de pequenas GTPases, como Rho e Cdc42, os quais promovem a reorganização do citoesqueleto de actina, responsável pelo o movimento celular (Van Haastert e Devreotes, 2004).

Todavia, a permanência no estado ativado destes receptores pode provocar respostas celulares prolongadas e exacerbadas que causam prejuízos ao organismo. Com a finalidade de prevenir estas respostas, os GPCRs sofrem finos mecanismos de regulação de sua atividade. Um dos principais mecanismos reguladores, denominado dessensibilização, consiste em diminuir a expressão do receptor na membrana, tornando as células menos responsivas aos mediadores quimiotáticos. Este processo pode resultar da ligação do próprio agonista (dessensibilização homóloga), ou pela ativação de receptores não relacionados (dessensibilização heteróloga) (Cotton e Claing, 2009). A interação entre o ligante e o receptor leva a ativação de enzimas específicas, principalmente as quinases de GPCRs (GRKs) que fosforilam o domínio citoplasmático dos receptores, gerando um sítio de reconhecimento para proteínas intracelulares, as  $\beta$ -arrestinas. Estas proteínas possuem alta afinidade pelos receptores fosforilados e, uma vez ligadas a estes receptores, induzem a internalização do complexo recém formado (Vroon e col., 2006). Deste modo, os receptores ativados são internalizados, cessando a resposta celular, e posteriormente degradados pela via dos proteassomas ou expressos novamente na superfície das células.

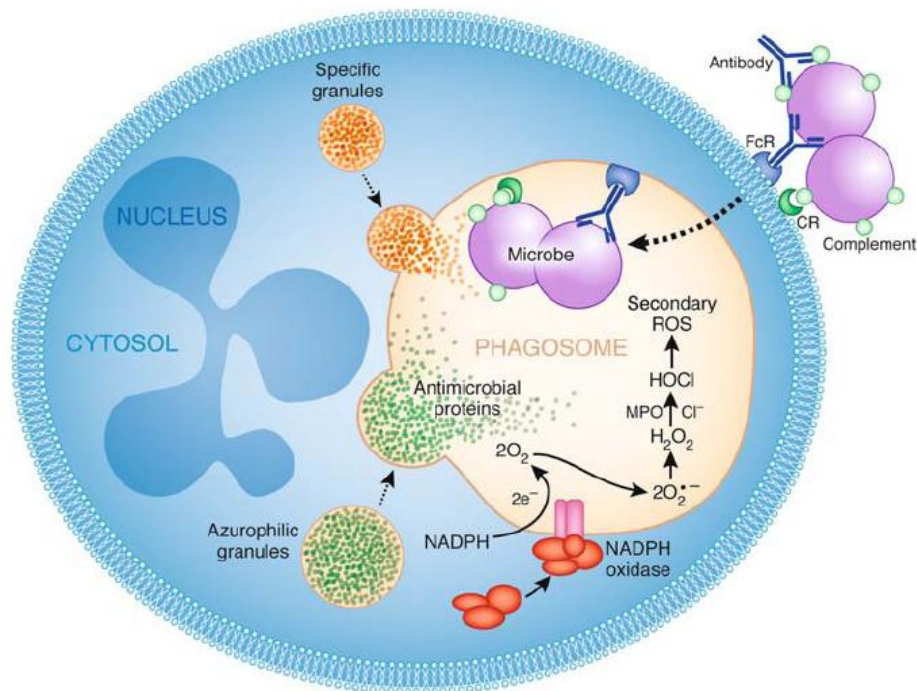
Uma vez no foco inflamatório, os neutrófilos fagocitam e eliminam os patógenos pela ação combinada de espécies reativas e moléculas citotóxicas armazenadas em grânulos (Kennedy e DeLeo, 2009). A fagocitose de microrganismos é iniciada pelo reconhecimento destes agentes nocivos por receptores específicos expressos na superfície de neutrófilos. A eficiência da fagocitose pode ainda ser aumentada com auxílio de opsoninas que recobrem os microrganismos e são reconhecidas por receptores de alta afinidade expressos pelas células fagocitárias (Dale e col., 2008). As principais opsoninas são a IgG e produtos do sistema complemento, principalmente a proteína C3b. A ligação do microrganismo ao receptor inicia o processo de fagocitose. Durante este processo, extensões citoplasmáticas se estendem ao redor do patógeno até englobá-lo por completo em um fagossomo criado pela membrana plasmática da célula (Robbins e col., 2004).

Os microrganismos são eliminados pela ação em conjunto de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), e enzimas citotóxicas armazenadas nos grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos. A produção de EROs depende da atividade da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase. Este complexo enzimático é constituído por proteínas que estão distribuídas no citoplasma e na membrana plasmática de neutrófilos quiescentes (Nauseef, 2007). Durante a ativação celular, os componentes protéicos que residem no citoplasma migram para a membrana dos fagossomas, onde se acoplam às



proteínas presentes na membrana e formam o complexo enzimático (Kennedy e DeLeo, 2009). A atividade desta enzima gera peróxido de hidrogênio e outras EROs como ânions superóxido ( $O_2^-$ ) que, em conjunto com a enzima mieloperoxidases, transformam íons cloreto em ácido hipocloroso, um potente composto anti-microbiano (Figura 3). Embora a participação de outros mecanismos microbicidas, tais como peptídeos microbianos (defensinas), proteases e ERNs, seja bem retratada, a produção de EROs e ácido hipocloroso são considerados as mais importantes (Dale e col., 2008). Pacientes portadores de doença granulomatosa crônica, por exemplo, são incapazes de produzir EROs derivadas da NADPH oxidase e apresentam quadros de infecções recorrentes (Geiszt e col., 2000).

Figura 3 - Atividades fagocítica e microbicida de neutrófilos



Legenda: Microrganismos invasores são reconhecidos e englobados por neutrófilos pela ação em conjunto de receptores FC e proteínas da cascata do complemento. Após o processo de fagocitose, os patógenos são eliminados por proteínas antimicrobianas armazenadas em grânulos e por espécies reativas produzidas pelo neutrófilo.

Fonte: Kennedy e col., 2009, f. 26.

Por serem dotados de grande potencial citotóxico, a ativação, a função e a sobrevivência de neutrófilos são finamente reguladas por um conjunto de sinais específicos presente no ambiente inflamatório (Filep e Keiber, 2009). Enquanto a sobrevivência de

neutrófilos é essencial para a eliminação de agentes nocivos, a permanência destas células imunológicas no sítio da inflamação pode provocar danos consideráveis aos tecidos adjacentes (Gilroy e col., 2004). A disfunção ou a resposta exacerbada de neutrófilos, associada a uma reparação inadequada, contribui para o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas, em especial o câncer. A permanência de agentes nocivos durante a inflamação, por exemplo, gera respostas prolongadas que resultam no acúmulo de moléculas potencialmente citotóxicas (Mantovani e col., 2008). Estas moléculas podem reagir com células normais do organismo, alterando o comportamento das mesmas. O surgimento de novas evidências que apontam para uma correlação entre a desregulação da resposta inflamatória e o desenvolvimento de tumores confirma esta premissa (Mantovani e col., 2008; Zheng e col., 2009).

Portanto, a remoção de neutrófilos e a ativação de mecanismos de reparo são eventos chave para a manutenção da homeostase tecidual. Neste contexto, a apoptose aparece como um mecanismo vital para a resolução da inflamação. A fagocitose de agentes nocivos ativa vias de sinalização que levam a uma diminuição drástica nas funções e na capacidade pró-inflamatória de neutrófilos, além de induzir a apoptose nestas células (Gilroy e col., 2004).

Estudos aprofundados levaram a descrição de duas vias de sinalização diferentes ativadas no processo apoptótico, a via extrínseca e a via intrínseca. A via extrínseca é modulada por ligantes de receptores de morte, tais como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (*tumor necrosis factor-alpha*, TNF- $\alpha$ ) e Fas, com formação do complexo de sinalização e indução de morte (*death-inducing signaling complex*, DISC), envolvimento de proteínas adaptadoras como o domínio de morte associado a Fas (*Fas-associated death domain*, FADD) e ativação de caspase-8 (Filep e Keiber, 2009). A via intrínseca, por sua vez, é induzida por um desequilíbrio entre as proteínas da família Bcl-2 que alteram a permeabilidade da membrana mitocondrial, permitindo a liberação de citocromo c e fatores apoptóticos, e a conseqüente formação do apoptossoma (Filep e Keiber, 2009). Ambas as vias culminam na ativação de uma proteína efetora, a caspase-3, responsável por desencadear a morte celular.

O processo apoptótico é acompanhado por profundas alterações morfológicas e, dentre elas, a exposição de fosfatidil serina representa uma etapa essencial para a remoção de neutrófilos por fagócitos profissionais. Normalmente, este fosfolípídeo encontra-se internalizado em células viáveis. Ao entrarem em apoptose, as células expõem a fosfatidil serina na superfície, sinalizando aos fagócitos profissionais, como os macrófagos, a presença

de células apoptóticas. Deste modo, estas células são removidas do sistema, contribuindo para a resolução da inflamação (Serhan e Savill, 2005).

## 1.2 Integrinas e sinalização intracelular

A sobrevivência de seres pluricelulares depende das interações entre as diferentes células do organismo ou com componentes da matriz extracelular (MEC). Estas interações são essenciais em processos biológicos como adesão, migração, proliferação e sobrevivência celular. A adesão, por exemplo, exerce um papel fundamental na transferência de informações entre as células. A interação com a matriz também sinaliza para o interior das células e pode levar a reorientação do citoesqueleto de actina, modificando o comportamento celular (Alberts e col., 2002).

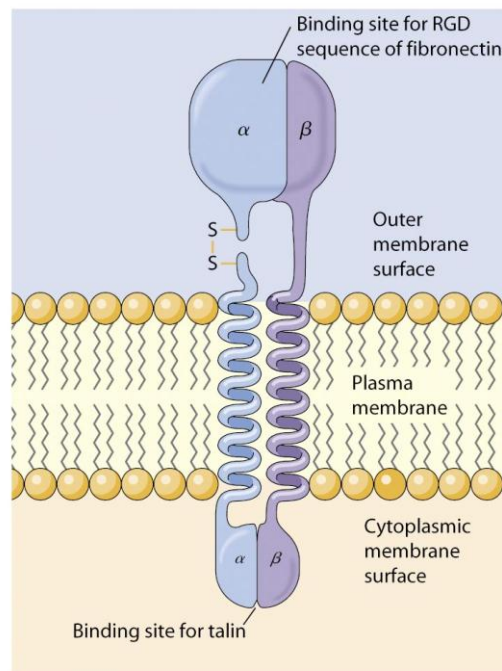
A ligação da MEC à célula requer a expressão de proteínas de adesão celular que atuem como receptor da matriz e conectem esta ao citoesqueleto celular. Atualmente, inúmeras classes de moléculas de superfície celular envolvidas na adesão foram identificadas e caracterizadas. Os principais representantes destas classes incluem as integrinas, as caderinas, os membros da superfamília de imunoglobulinas, as selectinas e seus ligantes (Alberts e col., 2002). Mais recentemente as proteínas ADAM (*A Desintegrin And Metaloprotease*) têm sido freqüentemente retratadas na literatura (Sun e col., 2007; Zigrino e col., 2011).

Dentre estas proteínas expressas em organismos pluricelulares, as integrinas são as mais abundantes e constituem uma das famílias mais estudadas e bem caracterizadas (Alberts e col., 2002). O termo integrina foi inicialmente proposto para ressaltar o papel destes receptores na integração do citoesqueleto celular com a MEC (Hynes e col., 2002). Estruturalmente, as integrinas são proteínas transmembrana heterodiméricas formadas por uma subunidade  $\alpha$  e uma subunidade  $\beta$ , associadas não covalentemente entre si (Figura 4). As subunidades  $\alpha$  possuem em seus domínios citoplasmáticos seqüências de aminoácidos altamente conservadas que estão relacionados a mecanismos de transdução de sinal (Hynes e col., 2002). A associação de diferentes subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  pode formar receptores com distintas especificidades de ligação e, conseqüentemente, com diversas atividades biológicas (Baker e Hagg, 2007).



Originariamente foram descritas três subunidades  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ), porém, este número estendeu-se para oito, enquanto o número de subunidades  $\alpha$  chega a dezoito. As diferentes subunidades das integrinas podem se combinar e formar 25 heterodímeros (Baker e Hagg, 2007). Este vasto repertório permite que as células interajam com uma infinidade de proteínas. As proteínas adesivas, embora estruturalmente diferentes, requerem seqüências de reconhecimento semelhantes para se ligarem às integrinas. Estas proteínas possuem em comum um resíduo de ácido aspártico ou de ácido glutâmico exposto, geralmente, em dobras estendidas e flexíveis. Das seqüências de aminoácidos que contêm ácido aspártico capazes de se ligarem às integrinas, a mais freqüente e mais estudada delas é a seqüência arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), 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 col., 2003).

Figura 4 - Representação esquemática da estrutura das integrinas



Legenda: As integrinas são constituídas por uma subunidade  $\alpha$  e uma subunidade  $\beta$ . 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](http://www.myvisiontest.com/img/integrin.jpg)

Estudos evolutivos realizados em metazoários primitivos revelaram que integrinas expressas em *Drosophila*, por exemplo, compartilham similaridades com integrinas encontradas em vertebrados. A *Drosophila* possui duas subunidades  $\beta$  e cinco subunidades  $\alpha$  que podem se combinar, formando agrupamentos com ligantes de laminina e do tripeptídeo RGD (Hynes e Zhao, 2000). Além disso, o genoma do cordado primitivo *Cone intestinalis* codifica onze genes para a subunidade  $\alpha$  e cinco para a subunidade  $\beta$ . Duas subunidades  $\alpha$  formam complexos com ligantes de laminina e uma terceira, com ligantes de RGD (Ewan e col., 2005). Estas evidências sugerem que metazoários primitivos possuíam integrinas primordiais que possivelmente originaram as integrinas conhecidas atualmente.

Baseado na subunidade  $\beta$ , as integrinas foram classificadas em vários subgrupos que apresentam certas características fisiológicas (Tabela 1). As integrinas  $\beta_2$  são expressas exclusivamente em leucócitos e desempenham um papel crucial no recrutamento dos mesmos para o sítio da inflamação (Yonekawa e Harlan, 2005). As integrinas  $\beta_1$ , por sua vez, contribuem para a organização dos tecidos através da ligação de proteínas da MEC com a membrana basal do tecido muscular, epitelial, nervoso e endotelial (Hynes e col., 2002). Por último, as integrinas  $\beta_3$  estão envolvidas na interação de ligantes vasculares como fibrinogênio, trombospondina e o fator Willebrand (Humphries e col., 2003).

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, sobretudo, devido à presença de proteínas acessórias que as conectam ao citoesqueleto de actina, às quinases citoplasmáticas e aos receptores de fatores de crescimento (Liu e col., 2000). A ativação e a subsequente sinalização disparada pelas integrinas dependem de modificações conformacionais que 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).

Estudos indicam que certas integrinas podem existir na superfície das células na conformação inativa (baixa afinidade) ou ativa (alta afinidade). A transição das integrinas de um estado de baixa afinidade para o estado de alta afinidade é acompanhada por modificações conformacionais no receptor (Moser e col., 2009). Análises estruturais revelam que em integrinas inativas, a região N-terminal de ligação do domínio extracelular encontra-se voltada para a membrana (Xiong e col., 2002). Durante a ativação da integrina, a região de ligação se posiciona de modo a permitir a interação com um ligante, promovendo várias

mudanças conformacionais na região de ligação da integrina que geram um sítio de alta afinidade pelo ligante (Figura 5).

Ao serem ativadas, as integrinas, por meio do domínio citoplasmático, passam a interagir com uma série de moléculas sinalizadoras. Várias proteínas com diferentes funções já foram identificadas como ligantes do domínio citoplasmático das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  das integrinas. Estas moléculas acessórias são ativadas sob a ação de estímulos específicos que podem variar de acordo com o tipo celular e com o próprio estímulo recebido pela célula (Liu e col., 2000).

Quando as integrinas se ligam às proteínas da MEC, as mesmas se agregam na base da membrana celular (*clustering* de integrinas) e se associam num complexo sinalizador que promove a organização dos filamentos de actina. Esta organização induz um maior agrupamento de integrinas, reforçando a ligação com a MEC. Como resultado, as proteínas da matriz, as integrinas e as proteínas do citoesqueleto se organizam em agregados, formando sítios especializados denominados pontos de adesões focais (Hynes e col., 2002). Os locais de adesão focal são pontos de interação entre integrinas e a MEC que mantêm agregados os receptores de adesão, moléculas de sinalização e o citoesqueleto de actina (Alberts e col., 2002). A ligação das proteínas de matriz com as integrinas leva à ativação de proteínas quinases, incluindo a quinase de adesão focal (*focal adhesion kinase*, FAK), que, por sua vez, ativam vias de sinalização intracelulares envolvidas e importantes processos biológicos como sobrevivência, crescimento, divisão celular e expressão gênica (Alberts e col., 2002).

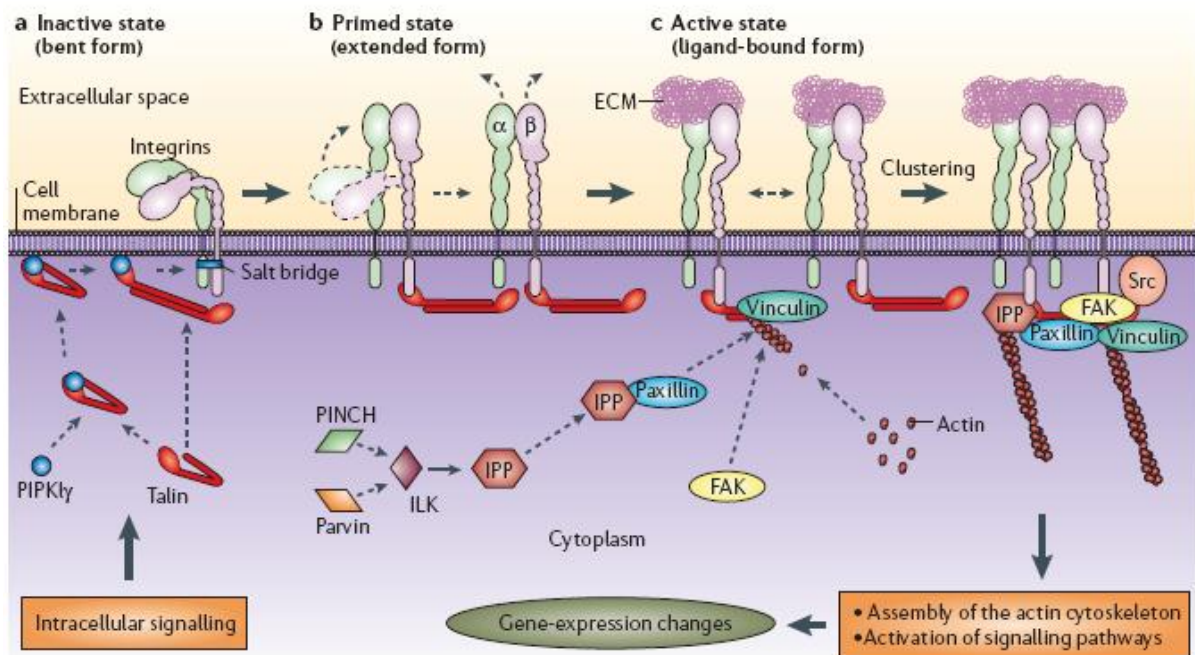
As integrinas apresentam um vasto repertório de mecanismos de transdução de sinal (Figura 6). As diferentes vias de sinalização induzidas pelas integrinas incluem a ativação de GTPases, como a Rho, que levam a mudanças na organização do citoesqueleto de actina, ativação de vias canônicas de sinalização como as das proteínas quinase ativadas por mitógeno (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) e PI3K, e ativação de uma variedade de proteínas quinases e fosfatases relacionadas a diversas funções celulares (Sundaram, 2006). Entretanto, a fosforilação da FAK parece ser uma etapa limitante para a progressão da sinalização celular associada às integrinas (Schwartz, 2001). A formação de agrupamentos de integrinas nos locais de contato célula-matriz induz o recrutamento da FAK com auxílio de proteínas de ancoramento intracelulares, tais como a paxilina e a talina que se ligam, respectivamente, as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  das integrinas (Shen e Guan, 2001). As moléculas de FAK recém agregadas sofrem autofosforilação no resíduo de tirosina 397 (Tyr<sup>397</sup>), o qual gera

Tabela 1. Classificação de integrinas de acordo com a subunidade  $\beta$ .

| INTEGRINA                              | LIGANTE   |
|--|---|
| <b>Integrinas <math>\beta_1</math></b> |   |
| $\alpha_1\beta_1$ (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  |
| <b>Integrinas <math>\beta_2</math></b> |   |
| $\alpha_D\beta_2$                      | 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  |
| <b>Integrinas <math>\beta_3</math></b> |   |
| $\alpha_{IIb}\beta_3$                  | Fibrinogênio, Fibronectina, Fator de von Willebrand, Vitronectina |
| $\alpha_v\beta_3$                      | Entactina, Vitronectina   |
| <b>Integrinas <math>\beta_4</math></b> |   |
| $\alpha_6\beta_4$                      | Laminina  |
| <b>Integrinas <math>\beta_5</math></b> |   |
| $\alpha_v\beta_5$                      | Vitronectina  |
| <b>Integrinas <math>\beta_6</math></b> |   |
| $\alpha_v\beta_6$                      | Tenascina, Vitronectina   |
| <b>Integrinas <math>\beta_7</math></b> |   |
| $\alpha_4\beta_7$                      | Fibronectina, MadCAM, VCAM  |
| $\alpha_E\beta_7$                      | E-caderina  |
| <b>Integrinas <math>\beta_8</math></b> |   |
| $\alpha_v\beta_8$                      | Colágeno, Fibronectina, Laminina                                  |

Fonte: Adaptada de [www.integrins.hipermat.net](http://www.integrins.hipermat.net)

Figura 5 - Estados conformacionais das integrinas.



Legendas: Normalmente as integrinas são encontradas nas membranas das células na forma inativa ou de baixa afinidade. A porção extracelular das integrinas fica voltada para a membrana, ocultando o sítio de interação com os ligantes de integrina (a). Sinais intracelulares provenientes de outros receptores ativam parcialmente as integrinas que passam a ficar estendidas (b). A mudança conformacional induzida pelos sinais intracelulares aumenta a afinidade das integrinas pelos componentes da MEC e a ligação com estes componentes resulta na formação de agrupamentos (clustering de integrinas) que ativam diferentes vias de sinalização (c).

Fonte: Legate e col., 2005, f. 21.

um sítio de alta afinidade para a ligação de membros da família Src de tirosinas quinases (Hynes e col., 2002).

A formação do complexo FAK-Src pode levar a fosforilação de outros resíduos de tirosina da FAK (como Tyr<sup>576</sup> e 577), aumentando a ativação desta enzima (Brunton e col., 2005). Os diferentes pontos de fosforilação geram novos sítios de ligação para outras moléculas de sinalização, como proteínas associadas ao citoesqueleto celular e quinases que ativarão outras moléculas sinalizadoras (Schwartz, 2001). Estas interações amplificam a sinalização intracelular e medeiam a ligação da FAK a vias que modificam o citoesqueleto, bem como àquelas associadas aos processos de migração e sobrevivência celular, como a via da Ras/Raf/MAPK e da PI3K (Sundaran, 2006).

Quando ativada, a PI3K induz a liberação de mediadores lipídicos, como o fosfoinositol trisfosfato (*phosphoinositol tri-phosphate*, PIP<sub>3</sub>), que atuam como segundos

mensageiros, ativando a Akt (PKB). Esta proteína, por sua vez, está envolvida tanto no controle da apoptose como também na ativação de pequenas GTPases como a Rac que induz a mobilização do citoesqueleto de actina (Figura 6) (Cantley, 2002).

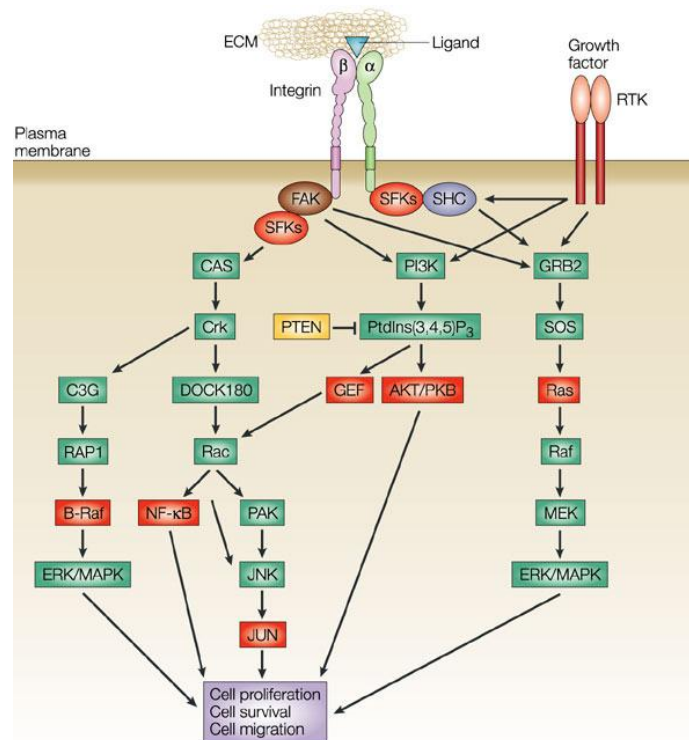
As MAPK, por outro lado, compõem uma família de proteínas quinase que fosforilam resíduos específicos de serina e treonina presentes nas proteínas alvo. Os substratos destas enzimas incluem desde outras proteínas quinase até fosfolipases, fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto de actina (Myamoto e col., 1996). Sabe-se que em organismos pluricelulares, a MAPK é constituída por três subfamílias bem descritas: a subfamília da ERK (*Extracellular Regulated Kinase*) (ERK 1 e 2), a subfamília da JNK (*Jun N-terminal Kinase*) (JNK1, 2 e 3) e a subfamília da p38 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) (Johnson e Lapadat, 2002).

A subfamília das ERKs é amplamente expressa em células de eucariotos e está associada a importantes processos celulares como divisão e proliferação. As vias de sinalização dependente de ERK podem ser ativadas por diversos estímulos que incluem fatores de crescimento, citocinas e componentes virais. A subfamília da JNK, por sua vez, é ativada em resposta a alguns estímulos tais como radiação ultravioleta, fatores de crescimento e mudanças na osmolaridade das células. Como consequência, a JNK transloca para o núcleo da célula e ativa fatores de transcrição, regulando a síntese de uma série de genes envolvidos na proliferação e na morte celular (Almeida e col., 2000). De forma similar, a p38 induz a expressão de uma infinidade de citocinas e, além disso, estudos recentes têm demonstrado uma importante contribuição desta subfamília para ativação da resposta imunológica. As diferentes isoformas da p38 são ativadas principalmente por ligantes de GPCR produzidos por agentes patogênicos (Johnson e Lapadat, 2002). Deste modo, a ativação de FAK mediada por integrinas e a consequente ativação das vias da MAPK produzem sinais fundamentais para o desenvolvimento e a sobrevivência dos organismos.

Vários estudos têm investigado os mecanismos moleculares envolvidos na transativação entre as integrinas e receptores com atividade tirosina quinase (tirosine kinase receptor, TKR) ou GPCRs. Existem evidências de que vias de sinalização intracelular associadas às integrinas podem ativar receptores de fatores de crescimento, tais como fator de crescimento epidermal (*epidermal grow factor*, EGF) e fator de crescimento da vasculatura endotelial (*vascular endothelial grow factor*, VEGF) (Koch e col., 2011). A formação do clustering de integrinas e suas associações com o citoesqueleto geram complexos formados por integrinas e TKRs que se agregam tornando-se parcialmente ativos (Koch e col., 2011). Inversamente, fatores de crescimento, como o VEGF, são capazes de ativar integrinas,

umentando a capacidade de interação entre as células e seus ligantes, bem como a migração celular (Flinder e col., 2011). Em adição, nosso grupo demonstrou recentemente que o receptor quimiotático de LTB<sub>4</sub>, um GPCR, modula as funções de células musculares através de mecanismos de transdução de sinal ativados pela integrina  $\alpha_v\beta_3$  (Moraes e col., 2010).

Figura 6 - 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: Guo e Giancotti, 2004, f. 817.

Os sinais provenientes das interações entre as integrinas e seus ligantes são transferidos através da membrana celular por uma variedade de vias de sinalização em um processo denominado sinalização "de fora para dentro" ("outside-in") (Hynes e col., 2002). Por outro lado, sinais intracelulares gerados pela ativação de receptores de fatores de crescimento ou de receptores quimiotáticos podem alterar a afinidade da integrina pelo seu

ligante. Este fenômeno é frequentemente referido pela literatura como sinalização “de dentro para fora” (“*inside-out*”) (Hynes e col., 2002). A ativação e a fosforilação de FAK pode ocorrer em ambos os casos e, conseqüentemente, pode levar a ativação de diferentes vias de sinalização relacionadas.

As integrinas estão presentes em todas as respostas celulares de neutrófilos a infecções ou a injúria. Inicialmente, acreditava-se que as integrinas participavam exclusivamente da adesão celular (Berton e col., 1996). Estudos posteriores, no entanto, mostraram que as integrinas oferecem um conjunto diversificado de sinais intracelulares que regulam muitas respostas celulares em leucócitos como fagocitose, migração e sobrevivência celular (Berton e col., 1999). Os neutrófilos expressam integrinas pertencentes a subfamília  $\beta_1$  ( $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$  e  $\alpha_9\beta_1$ ) a subfamília  $\beta_2$  ( $\alpha_D\beta_2$ ,  $\alpha_L\beta_2$ ,  $\alpha_M\beta_2$  e  $\alpha_X\beta_2$ ) e a subfamília  $\beta_3$  ( $\alpha_V\beta_3$ ), sendo as integrinas  $\beta_2$  predominantes neste tipo celular (Lowell e Berton, 1999).

Está bem estabelecido na literatura que as integrinas  $\alpha_M\beta_2$  são primordiais para os processos de migração e fagocitose em neutrófilos (Gresham e col., 1991; Lowell e Berton, 1999). Em concordância, pacientes com deficiência de adesão leucocitária (*leukocyte adhesion deficiency*, LAD), uma condição caracterizada pela ausência ou deficiência de integrinas  $\beta_2$ , apresentam um profundo comprometimento da resposta de neutrófilos aos agentes invasores (Gresham e col., 1991). Além disso, nosso grupo demonstrou recentemente que as integrinas  $\alpha_9\beta_1$  ativam importantes vias de sinalização associadas ao aumento da sobrevivência de neutrófilos, permitindo que estas células alcancem o foco inflamatório e eliminem os agentes causadores da lesão (Saldanha-Gama e col., 2010).

Portanto, torna-se evidente que as integrinas não representam apenas um grupo de moléculas estruturais da superfície celular, mas também são proteínas capazes de transmitir sinais, para importantes processos celulares e patológicos, em ambas as direções através da membrana celular (Guo e Giancotti, 2004).

### 1.3 A família de proteínas ADAM

A ativação de moléculas de adesão celular, bem como o remodelamento da matriz e o processamento de proteínas transmembrana pela ação de proteases são eventos fundamentais para a biologia dos seres vivos (Cominetti e col., 2009; Estrella e col., 2009). A



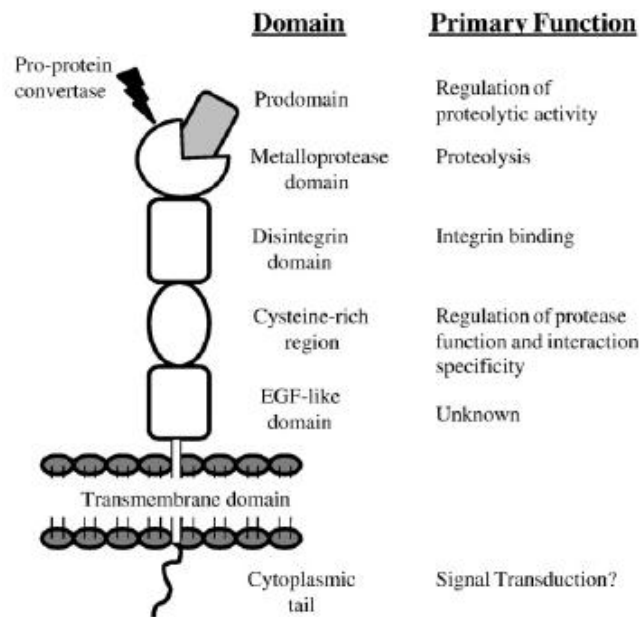
essencialidade destes processos é bem ilustrada nos fenômenos da inflamação e reparo tecidual. O recrutamento de leucócitos para tecidos lesionados, por exemplo, requer a expressão de moléculas de adesão pelas células imunológicas e pelo endotélio. A remoção de agentes nocivos é acompanhada pela cicatrização do tecido lesionado através da proliferação celular e o remodelamento tecidual mediados pelas proteases (Robbins e col., 2004).

Uma grande variedade de proteínas relacionadas à adesão celular ou com capacidade catalítica participa destes eventos celulares e, dentre elas, uma nova classe de moléculas é freqüentemente retratada na literatura. Seus membros conhecidos como desintegrinas celulares incluem as ADAM e as ADAM com resíduos de trombospondina (ADAM with thrombospondin motifs, ADAMTS) (Bridges e col., 2005; Yang e col., 2006). As ADAM são proteínas transmembrana membros da família das proteases dependentes de zinco que inclui as metaloproteinases de matriz (matrix metalloproteinase, MMP) e as metaloproteinases de veneno de serpentes (snake venom metalloproteinase, SVMP) (Edwards e col., 2008). Todas as proteínas pertencentes à família das ADAM apresentam um padrão de organização em comum e com funções específicas como proteólise, adesão e sinalização celular.

Estudos mais aprofundados sobre esta família levaram a descrição de 8 diferentes domínios ou regiões com papéis específicos (Duffy e col., 2009). As proteínas ADAM são constituídas por uma seqüência sinal, um pró-domínio, um domínio metaloprotease, um domínio tipo-desintegrina ou ligante de integrina contendo uma região rica em cisteína, além de domínios tipo-EGF, transmembrana, e uma cauda citoplasmática (Figura 7). Pelo fato de apresentarem ambos os domínios metaloprotease e desintegrina, as proteínas ADAM podem atuar tanto como enzimas proteolíticas, quanto ligantes de integrinas, sendo estas duas propriedades importantes na manutenção estrutural e funcional de tecidos e órgãos.

Atualmente, 40 proteínas ADAM foram identificadas em mamíferos, sendo 19 em humanos (tabela 2). Algumas destas proteínas também foram descritas em metazoários mais primitivos como *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* e *Xenopus* (Pan e Rubin, 1997). A diversidade de proteínas ADAM com funções específicas destaca a relevância desta família para a biologia dos seres vivos. As proteínas ADAM são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e em seguida, transportadas para o complexo de Golgi onde sofrerão o processo de maturação, o qual consiste na clivagem e remoção do pró-domínio, ativando o domínio metaloprotease (Roghani e col., 1999). A clivagem ocorre durante o transporte vesicular das proteases do complexo de Golgi para a membrana e pode ser bloqueada por inibidores da via secretória (Novak, 2004).

Figura 7 - Estrutura das proteínas pertencentes a família ADAM



Legenda: As proteínas ADAM são constituídas basicamente por um pró-domínio, pelos domínios metaloprotease, tipo-desintegrina contendo uma região rica em cisteína, tipo-EGF, transmembrana e citoplasmático.

Fonte: Duffy e col., 2009, f. 32.

Os domínios estruturais das proteínas ADAM compartilham similaridades com os domínios encontrados na família de proteínas solúveis do veneno de serpente. As metaloproteases de veneno de serpente e as ADAM, dentre as proteínas de superfície celular, são as únicas relacionadas tanto na adesão quanto na atividade proteolítica (Wolfsberg e col., 1995). De fato, algumas SVMP e ADAM são capazes de clivar moléculas de matriz extracelular, bem como proteínas de superfície celular. Além disso, como todas as metaloproteases, a atividade catalítica das ADAM é fortemente inibida por quelantes de íons zinco. As funções propostas para o domínio metaloprotease das ADAM incluem a degradação das proteínas de matriz e a clivagem de moléculas ancoradas nas membranas das células como citocinas ou fatores de crescimento (Black e White, 1998).

A proteína ADAM17, também denominada enzima conversora de  $TNF\alpha$  (*TNF\alpha* *Converting Enzyme*, TACE), é a protease mais bem caracterizada atualmente. Ela é responsável por clivar especificamente o precursor de  $TNF\alpha$ . Esta citocina desempenha um papel importante na mobilização das defesas do hospedeiro contra a invasão de agentes nocivos, mas em excesso pode provocar danos consideráveis aos tecidos como é observado

em doenças auto-imunes (Bell e col., 2007). O precursor de TNF $\alpha$  é sintetizado como uma proteína transmembrana e a clivagem proteolítica no domínio extracelular é necessária para liberar a forma solúvel da citocina (Black e White, 1998). Estudos recentes mostraram que camundongos geneticamente deficientes para TACE são incapazes de clivar o receptor de TNF, a molécula de adesão L-selectina e o precursor de proteína amilóide, sugerindo que esta proteína é uma secretase com múltiplos substratos (Primakoff e Myles, 2000).

Outra função importante desempenhada pelas proteínas ADAM está relacionada à liberação proteolítica de fatores de crescimento. Normalmente, a síntese de fatores de crescimento é controlada em nível transcricional. Por outro lado, muitos destes fatores são produzidos em formas precursoras inativas e ancorados na membrana ou na matriz, o que possibilita outra forma de regulação, através da clivagem realizada por proteínas ADAM. Muitos ligantes para receptores de EGF são liberados da superfície celular em resposta a diferentes estímulos. A ativação do receptor de EGF depende do processamento destes ligantes por metalopeptidases como a ADAM9. As proteínas ADAM10 e 12 também parecem participar do processamento de ligantes do receptor de EGF em diferentes linhagens celulares (Shirakabe e Werb, 2002; Estrella e col., 2009).

Os mecanismos que levam a ativação de proteínas ADAM e a conseqüente clivagem de citocinas ou de fatores de crescimento ainda não foram completamente elucidados. A habilidade de uma ADAM em liberar substrato é modulada por fosforilação ou pela ligação de proteínas acessórias à cauda citoplasmática. As modificações da cauda citoplasmática de uma ADAM poderiam afetar sua expressão na superfície celular, a sua localização em um domínio específico de membrana, a associação com outras proteínas de superfície ou sua habilidade de clivar substratos específicos em resposta a estímulos específicos (White, 2003). Em adição, inúmeras evidências sugerem que proteínas G podem alternativamente regular a atividade catalítica destas proteínas, ativando, assim, o receptor de EGF (Figura 8) (Draub e col., 1996).

Em algumas proteínas ADAM, a seqüência catalítica clássica no domínio metaloprotease está ausente, sugerindo que estas proteínas participam em outros 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 claramente 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).

Tabela 2 - Alguns membros da família ADAM.

| ADAM   | Outros nomes                        | Tipo | Funções   | Integrinas  | Localização                                    |
|--------|-------------------------------------|------|---|---|--|
| ADAM1  | Fertilin- $\alpha$ , PH-30 $\alpha$ | NP   | Fusão espermatozóide-óvulo                                    | $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 9\beta 1$   | Espermatozóide                                 |
| ADAM2  | Fertilin- $\beta$ , PH-30 $\beta$   | NP   | Fusão espermatozóide-óvulo                                    | $\alpha 4\beta 1$ , $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 9\beta 1$   | Espermatozóide                                 |
| ADAM3  | CYRN, tMDC                          | NP   |   | $\alpha 4\beta 1$ , $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 9\beta 1$   | Espermatozóide                                 |
| ADAM8  | MS2                                 | P    | Infiltração de neutrófilos                                    |   | Macrófagos e neutrófilos                       |
| ADAM9  | MDC9, MCMP, Meltrin- $\gamma$       | P    | Clivagem de HB-EGF e APP, digestão de fibronectina e gelatina | $\alpha 2\beta 1$ , $\alpha 6\beta 1$ , $\alpha 6\beta 4$ , $\alpha 9\beta 1$ e $\alpha V\beta 5$ | Vários tecidos                                 |
| ADAM11 | MDC                                 | NP   |   |   | Cérebro  |
| ADAM12 | Meltrin- $\alpha$ , MCMP, MLTN      | P    | Disgestão de colágeno IV, fibronectina e gelatina             | $\alpha 4\beta 1$ , $\alpha 7\beta 1$ e $\alpha 9\beta 1$   | Osteoblastos, condrócitos                      |
| ADAM15 | Metargidin, MDC15                   | P    | Digestão de colágeno IV e gelatina                            | $\alpha V\beta 3$ , $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha 9\beta 1$   | Osteoclastos, condrócitos, células endoteliais |
| ADAM17 | TACE, c5VP                          | P    | Clivagem de TNF- $\alpha$ , APP e TGF- $\beta$                | $\alpha 5\beta 1$   | Macrófagos e vários tecidos                    |
| ADAM19 | Meltrin- $\beta$                    | P    | Formação de neurônios   | $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$   | Testículos                                     |
| ADAM23 | MDC3                                | NP   |   | $\alpha V\beta 3$   | Cérebro e coração                              |
| ADAM24 | Testinase-1                         | NP   | Fusão espermatozóide-óvulo                                    |   | Testículos                                     |
| ADAM28 | E-MDC II, MDC-Lm, MDC-Ls            | P    | Digestão de IGFBP   | $\alpha 4\beta 1$ , $\alpha 4\beta 7$ e $\alpha 9\beta 1$   | Testículos, pulmão, linfócitos                 |
| ADAM33 |                                     | P    | Clivagem de APP e cadeia $\beta$ da insulina                  | $\alpha 4\beta 1$ , $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha 9\beta 1$   | Pulmão   |

Legenda: APP (Amyloid precursor protein), HB-EGF (Heparin-binding EGF), IGFBP-3 (Insulin Growth Factor Binding-Protein 3), NP (Non-Proteinase type, sem atividade proteolítica), P (Proteinase type, com atividade protelítica), TGF (Transforming Growth Factor), TNF (Tumor Necrosis Factor).

Fonte: Modificado de Mochizuki, 2007, f. 37.

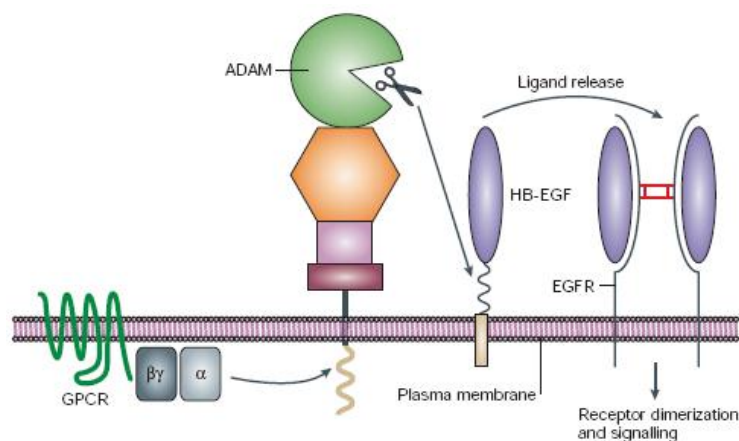
A capacidade adesiva das proteínas ADAM foi originalmente descrita no processo de fertilização em murinos. As fertilinas  $\alpha$  (ADAM1) e  $\beta$  (ADAM2) são encontradas como um heterodímero de superfície de espermatozóide. Ambas as proteínas são sintetizadas no testículo como precursoras e são processadas proteoliticamente durante o desenvolvimento do espermatozóide (White, 2003). Segundo a literatura, o heterodímero de fertilina está envolvido na ligação e na fusão do espermatozóide ao óvulo. A clonagem de genes que codificam as subunidades das fertilinas revelou a presença de um domínio desintegrina na subunidade  $\beta$  e um peptídeo de fusão na subunidade  $\alpha$ . Isto levou à hipótese de que a fertilina

se liga a uma integrina na superfície do óvulo através do domínio desintegrina da sua subunidade  $\beta$ , enquanto a subunidade  $\alpha$  medeia à união das membranas plasmáticas opostas (Huovila e col., 1996). A utilização de inibidores para o domínio desintegrina das fertilinas foi capaz de interferir com o processo de fertilização, confirmando esta hipótese (White, 2003).

O termo desintegrina foi inicialmente proposto para descrever um grupo de peptídeos de baixo peso molecular, rico em cisteína, que interagem com as integrinas presentes na superfície celular (Niewiarowski e col., 1994). Muitas desintegrinas são descritas como potentes inibidores de agregação plaquetária e da adesão celular, devido à existência do tripeptídeo RGD na seqüência de aminoácidos (Maclane e col., 2004).

Dentre os vários membros da família ADAM, apenas a proteína ADAM15 contém a seqüência RGD em seu domínio desintegrina, possibilitando a interação com as integrinas expressas pelas células do organismo. Esta proteína, por exemplo, desempenha um papel importante na regulação da permeabilidade do endotélio vascular e no recrutamento de neutrófilos através das interações com as integrinas  $\alpha_5\beta_1$  e  $\alpha_v\beta_3$  (Sun e col., 2010). Por outro lado, existem vários relatos na literatura de que o domínio desintegrina das proteínas ADAM, assim como as desintegrinas de veneno de serpentes, podem apresentar seqüências alternativas de ligação com integrinas, principalmente o tripeptídeo ácido glutâmico-cisteína-ácido aspártico (ECD) (Calvete e col., 2005).

Figura 8 - Processamento de proteínas transmembrana



Legenda: As proteínas ADAM clivam fatores de crescimento como HB-EGF em resposta a ativação de GPCRs.

Ao ser liberado, o fator de crescimento se liga nos receptores de EGF, ativando vias de sinalização associados a diversas respostas celulares tais como proliferação, migração e sobrevivência celular.

Fonte: Blobel, 2005, f. 32.

Newton e colaboradores, em 2010, mostraram que a ADAM23, mesmo não possuindo a seqüência RGD, é capaz de interagir com a integrina  $\alpha_v\beta_3$ , confirmando estes relatos. As proteínas ADAM23 participam principalmente na diferenciação e na orientação de células neurais, sendo indispensáveis para o desenvolvimento do sistema nervoso (Sun e col., 2007). Entretanto, foi demonstrado recentemente que as proteínas ADAM23 inibem a ativação da integrina  $\alpha_v\beta_3$  durante o processo metastático de células tumorais, contribuindo para a redução do tamanho de tumores. Em concordância, muitas linhagens tumorais regulam negativamente a atividade desta proteína por meio de modificações epigenéticas (Takada e col., 2005).

Embora participem de importantes processos biológicos, a expressão alterada das proteínas ADAM está freqüentemente correlacionada ao desenvolvimento de diversas patologias que incluem artrite reumatóide, asma, doenças cardiovasculares, Alzheimer e câncer (Duffy e col., 2009). A proteína ADAM15, por exemplo, não é expressa em vasos normais. Ela é regulada positivamente em lesões de aterosclerose, no qual muitos macrófagos estão presentes. É possível que o domínio da ADAM15 interaja com a integrina  $\alpha_v\beta_3$  de macrófagos, contribuindo para a aterogênese. A síndrome de Alzheimer, por sua vez, é uma doença terminal caracterizada pelo acúmulo de proteínas beta amilóides no cérebro que pode ser resultado da atividade catalítica excessiva de determinadas ADAM, como a proteína ADAM9 (Hotoda e col., 2002).

Dentre as patologias associadas à disfunção de proteínas ADAM, o câncer tem recebido o merecido destaque da literatura devido à notável capacidade que as células transformadas possuem em controlar as várias maquinarias do organismo para benefício próprio. Muitos trabalhos investigam a contribuição de determinadas ADAM, em particular a ADAM9, no desenvolvimento de diferentes tipos de tumor.

#### **1.4 ADAM9 e progressão tumoral**

A presença dos domínios metaloprotease e desintegrina na estrutura das ADAM confere as proteínas desta família características importantes e permite que elas participem de diversos eventos celulares tais como remodelamento tecidual, processamento de proteínas

ancoradas à membrana e adesão celular. Estes processos são fundamentais para a manutenção e o funcionamento adequado do organismo.

Por outro lado, os eventos mencionados também são observados em células tumorais. Neste consenso, várias proteínas ADAM possuem a expressão alterada em diferentes linhagens tumorais. O aumento da expressão de um membro desta família em particular, a ADAM9, está frequentemente associada ao desenvolvimento de tumores. A proteína ADAM9 foi originalmente descrita em câncer de mama (Weskamp e col., 1996), no entanto, estudos posteriores identificaram a presença desta proteína em outros tumores humanos tais como câncer 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.

As células transformadas que compõe a massa tumoral são dotadas de uma incrível capacidade de invadir outros órgãos, caracterizando o processo de metástase. Este processo consiste em conjunto de eventos complexos altamente coordenados que incluem a disseminação das células a partir do tumor primário, a migração pela matriz extracelular, invasão e colonização de tecidos adjacentes, e a angiogênese. A expressão exacerbada de ADAM9 aparece como um mecanismo alternativo de sobrevivência de células tumorais, pois estas proteínas oferecem todos os aparatos celulares necessários para a realização dos processos mencionados.

É bem descrito que o domínio metaloprotease de ADAM9 participa da degradação de componentes de matriz, permitindo a migração das células tumorais. Em adição, foi demonstrado que a ADAM9 também é capaz de processar fatores de crescimento essenciais para o desenvolvimento de tumores. A contribuição desta proteína para o estabelecimento de células transformadas é comprovada por estudos onde animais geneticamente deficientes para ADAM9 apresentam uma redução no tamanho da massa tumoral (Guaiquil e col., 2009).

Formas solúveis de ADAM9 foram descritas como importantes mediadores da metástase de tumores no fígado (Mazzoca e col., 2005). Após ser clivada da membrana de células hepáticas, a ADAM9 solúvel se liga as integrinas  $\alpha_6\beta_4$  e  $\alpha_2\beta_1$  expressa na superfície de células malignas e promove a interação estroma-tumor. Análises histológicas de carcinoma de fígado revelaram que a forma solúvel da ADAM9 encontrava-se maior quantidade na região de contato entre o estroma e o tumor, em comparação com as células tumorais e hepatócitos propriamente ditos.

Outra função desempenhada pela ADAM9 no desenvolvimento de tumores está associada ao domínio desintegrina. Esta proteína, assim como muitas ADAM, possui uma seqüência ECD no domínio desintegrina, permitindo que seja reconhecida por diferentes integrinas. Karadag e colaboradores, em 2006, mostraram que a proteína ADAM9 é amplamente expressa em mielomas e é responsável por mediar as interações entre estas células e osteoblastos através das integrinas  $\alpha_V\beta_5$ . O mieloma múltiplo é uma doença caracterizada pelo crescimento de células transformadas dentro da medula óssea. O crescimento e sobrevivência destas células são regulados pelas interações entre células tumorais e as células mielóides ou com osteoblastos. A ADAM9 aparece como a principal proteína envolvida nestas interações (Karadag e col., 2006). O domínio desintegrina ativa a via da p38 em osteoblastos que culmina na síntese de IL-6, contribuindo para o desenvolvimento das células malignas (Karadag e col., 2006).

A ADAM9 parece contribuir de forma similar na sobrevivência de melanomas (Zigrino e col., 2010). Existem inúmeras evidências de que esta proteína é super expressa em melanomas (Zigrino e col., 2005). A utilização de uma proteína recombinante revelou que o domínio desintegrina da ADAM9 é reconhecido especificamente pelas integrinas  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$  expressos em fibroblastos. Além disso, a ADAM9D foi capaz de ativar vias de sinalização que levaram ao aumento da expressão de metaloproteinases de matriz em melanomas. Em contrapartida, o silenciamento da proteína ADAM9 nas células malignas reduziu consideravelmente as interações melanoma-fibroblasto e, conseqüentemente, o tamanho do tumor, sugerindo que esta proteína desempenha um papel crucial na interação direta entre estes dois tipos celulares (Zigrino e col., 2010).

Contudo, estudos recentes demonstram que o tratamento de células malignas que compõe o tumor de mama com o domínio desintegrina da ADAM9 foi capaz de inibir a ativação das integrinas expressas nestas células, contribuindo para a redução da massa tumoral (Cominetti e col., 2009). Em adição, formas solúveis e transmembranar da ADAM9 parecem exercer funções contrárias na progressão de tumores (Fry e Toker, 2010). A expressão aumentada de formas solúveis de cadeia longa da proteína ADAM9 inibiu fortemente a migração de células tumorais. O mesmo fenômeno não foi observado em células que super expressam formas solúveis de cadeia curta. Pelo contrário, estas proteínas potencializaram a resposta migratória. Resultados similares foram obtidos em células tumorais silenciadas para o gene que codifica a proteína ADAM9 (Fry e Toker, 2010), sugerindo que as formas solúveis e transmembranar da proteína ADAM9 desempenham



papéis contraditórios na progressão do tumor. A existência de tais evidências destaca a necessidade de estudos mais aprofundados sobre a dinâmica do funcionamento da ADAM9.

Além disso, diversos trabalhos têm abordado a contribuição do domínio metaloprotease das proteínas ADAM em importantes processos celulares, enquanto o papel do domínio desintegrina é pouco discutido na literatura. No presente estudo, utilizamos o domínio desintegrina da proteína ADAM9 como uma ferramenta para melhor entender os mecanismos utilizados pelas células tumorais para interagir com as células normais do organismo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O presente estudo visa avaliar um possível papel modulador desempenhado pelo domínio desintegrina da ADAM9 sobre a ativação de neutrófilos.

### 2.2 Objetivos específicos

Dentro do objetivo geral proposto neste estudo, procuramos investigar mais especificamente os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos induzidos pela ADAM9D sobre importantes funções efetoras de neutrófilos. Para isso, utilizamos um modelo experimental, no qual neutrófilos humanos recém isolados do sangue periférico de doadores saudáveis são estimulados *in vitro* com ADAM9D e, em seguida, utilizados em experimentos que avaliam parâmetros de funcionalidade de neutrófilos como a capacidade migratória em resposta a agentes quimiotáticos clássicos (IL-8, LTB<sub>4</sub> e fMLP) além da própria ADAM-9D, e a apoptose em neutrófilos. Analisamos também o envolvimento de determinadas integrinas no recrutamento de neutrófilos induzidos pela ADAM9D. Ainda neste estudo, procuramos investigar as vias de sinalização ativadas na migração destas células, bem como a participação do receptor quimiotático CXCR2 neste processo.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Reagentes

Para a realização deste projeto foram utilizados Percoll obtido da Amersham Biosciences (Piscataway, NJ), meio de cultura RPMI obtido da Gibco (Carlsbad, CA) e membranas de quimiotaxia de polycarbonato com poros de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Neuroprobe Inc.). O inibidor seletivo para CXCR2, SB225002, foi obtido da Calbiochem (Darmstadt, Alemanha). A repertaxina e a toxina pertussis foram gentilmente cedidas pelo Dr. Erik Svenjö e o Dr. Cláudio Canetti, respectivamente. Os inibidores farmacológicos de PI3K (LY294002 e Wortmanina) e de p38 (SB203580) foram obtidos da Calbiochem. As membranas de difluoreto de polividileno (PVDF) foram adquiridas da Amersham (Piscataway, NJ, EUA). Todos os anticorpos utilizados foram comprados da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA). O sistema ECL foi obtido da Pierce Biotechnology (Rockford, IL, EUA).

#### 3.2 Isolamento de neutrófilos

Os neutrófilos humanos foram isolados de sangue periférico de doadores voluntários saudáveis seguindo protocolo estabelecido no laboratório (Coelho e col., 2001). O isolamento foi realizado por centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll, segundo o protocolo estabelecido no laboratório. Os gradientes descontínuos foram montados em tubos de 15mL com 2mL de cada uma das quatro soluções de Percoll diluídas em solução balanceada de Hank's (72%, 63%, 54% e 45%). As soluções foram dispostas em ordem crescente de concentração, com a solução mais concentrada (72%) no fundo e a menor (45%) no alto do tubo. Em seguida, o sangue venoso coletado foi transferido para um tubo contendo de EDTA 5% em PBS, na proporção de 1 mL de sangue para cada 50  $\mu\text{L}$  de solução de EDTA. O sangue (2 mL) foi então colocado cuidadosamente nos tubos com os gradientes e centrifugado a 500g por 35 minutos, a temperatura ambiente, com baixa aceleração e desaceleração. Ao final da centrifugação, os neutrófilos formam um anel presente na interface entre as soluções

de 63% e 72%. Este anel foi coletado e transferido para um tubo novo (Figura 6). As hemácias contaminantes foram lisadas com tampão de lise cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  155mM, EDTA 1 $\mu\text{M}$ ,  $\text{KHCO}_3$  10mM, pH 7.4). O tubo foi centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet (neutrófilos) ressuspensos em solução balanceada de Hank's. O tubo foi novamente centrifugado, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspensos em meio de cultura RPMI-1640.

### 3.3 Contagem e tratamento das células

O número de células presentes na suspensão celular foi determinado por contagem em câmara de Neubauer por coloração com líquido de Turk. A viabilidade celular foi determinada também em câmara de Neubauer pelo método de exclusão de Azul de Tripán. Finalmente, a pureza da separação de neutrófilos foi determinada pela contagem da porcentagem de neutrófilos presentes em lâminas de citocentrífuga coradas com panótico. A pureza e viabilidade dos neutrófilos isolados foram sempre >97% e >99%, respectivamente. As células recém isoladas ( $10^6$  neutrófilos/mL em RPMI) foram estimuladas com ADAM9D (100 nM) por 1 hora a 37°C. Para o experimentos utilizando os inibidores farmacológicos, as células foram pré-incubadas com o inibidor alostérico de CXCR2, a repertaxina (1  $\mu\text{M}$ ) por 15 minutos, o inibidor seletivo para CXCR2, SB225002 (1  $\mu\text{M}$ ) por 30 minutos, os anticorpos neutralizantes para as integrinas  $\alpha_5$  e  $\alpha_v$  (10  $\mu\text{g/mL}$ ) por 5 minutos, os inibidores para PI3K, LY294002 (10  $\mu\text{M}$ ) e Wortamanina (100 nM), e inibidores para p38, 203580 (10  $\mu\text{M}$ ) e a Toxina pertussis (100 ng/mL) por 30 minutos. Após este tempo, as células foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI para utilização nos ensaios.

### 3.4 Quimiotaxia em câmara de Boyden

A migração de neutrófilos foi avaliada em câmara de Boyden de 48 poços (Neuroprobe Inc.), seguindo o protocolo estabelecido no laboratório (Coelho e col., 2001). Nesta metodologia, 28,5  $\mu\text{l}$  dos estímulos quimiotáticos, IL-8 (30 n), fMLP ( $10^{-7}$  M), LTB<sub>4</sub>

(100 nM) ou ADAM9D (1 nM - 1  $\mu$ M) foram adicionados nos poços da parte inferior da câmara. Os neutrófilos tratados como descrito ( $5 \times 10^4$  células em 50  $\mu$ l) foram adicionados nos poços superiores da câmara. Os poços inferiores contendo os estímulos quimiotáticos e os poços superiores com as células foram separadas por um filtro de policarbonato com 5  $\mu$ m de diâmetro. A câmara foi incubada por 1 hora a 37°C. Após a incubação, o filtro foi retirado cuidadosamente da câmara e lavado com solução salina para remover as células que não migraram (presentes na parte superior do filtro). O filtro foi então fixado e corado, utilizando o kit “Diff Quick” (Baxter Travenol Laboratories). As concentrações dos estímulos quimiotáticos foram escolhidas com base em experimentos anteriores do laboratório e concentrações utilizados em ensaios similares descritos na literatura. O número de neutrófilos que migraram em resposta aos estímulos quimiotáticos foi determinado pela contagem em microscopia ótica sob aumento de 1000x, de pelo menos cinco campos escolhidos aleatoriamente. Cada um dos pontos experimentais foi feito em triplicata. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  D.P. do número de neutrófilos por poço.

### **3.5 Análise da produção de ERO através da reação com luminol**

As células ( $2 \times 10^5$  neutrófilos/mL) suspensas em solução balanceada de Hank's sem vermelho de fenol foram aplicadas em placas de 96 poços e tratadas com ADAM9D (100 nM) ou forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, 100 nM), nosso controle positivo. Seguindo a estimulação, as células foram incubadas com luminol e a quimiluminescência gerada pela reação de oxidação do luminol por ânions superóxido ( $O_2^-$ ) foi analisada no EnVision (PerkinElmer).

### **3.6 Análise da apoptose de neutrófilos por citometria de fluxo**

Neutrófilos ( $10^6$  células) recém isolados foram incubados em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) na presença ou na ausência de ADAM9D (100 nM) por 20 horas a 37°C em atmosfera de 5% de  $CO_2$ . Células frescas foram

utilizadas como controle negativo para o experimento (controle 0 hora). Após o tempo de incubação, as células foram centrifugadas (3000 rpm por 5 minutos), os sobrenadantes descartados e os pellets ressuspensos em tampão de ligação (Hepes 10 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM; KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM; CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM). Os neutrófilos foram então novamente centrifugados (3000 rpm por 5 minutos), os sobrenadantes descartados e as células incubadas em 100 µL de tampão de ligação contendo anexina V conjugada a um fluoróforo, o FITC (1:500) por 20 minutos a temperatura ambiente, na ausência de luz. Após a incubação, o volume das células foi completado para 500 µL com tampão de ligação seguido da adição de 4 µL iodeto de propídeo (PI, 100 µg/mL). As amostras (10.000 células dentro da população de neutrófilos) foram imediatamente adquiridas no citômetro de fluxo (Accuri C6). A fluorescência emitida pela anexina V e pelo PI analisados no programa do Accuri C6 foram expressas em quadrantes. O resultado representa o número de neutrófilos marcados positivamente para a anexina V.

### **3.7 Determinação do potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) por citometria de fluxo**

A mudança do potencial da membrana foi analisada pelo método de JC-1 (Molecular Probes). Em células íntegras, este marcador encontra-se em forma de monômeros no citoplasma (fluorescência verde) e em forma de agregados na mitocôndria, denominado agregados J (fluorescência vermelha). Por outro lado, nas células apoptóticas os agregados J são convertidos em monômeros, devido à perda do potencial da membrana mitocôndria e, conseqüentemente, passam a emitir a fluorescência verde, caracterizando o processo de apoptose. As células (10<sup>6</sup> neutrófilos/mL) recém isoladas foram tratadas como descrito anteriormente. Após o tempo de estimulação, os neutrófilos foram incubados com 10 µg/mL de JC-1 por 30 minutos a 37°C. As amostras (10.000 células dentro da população de neutrófilos) foram adquiridas imediatamente no citômetro de fluxo (Accuri C6). O resultado foi expresso como razão entre as fluorescências vermelha e verde.

### 3.8 Eletroforese e Westernblotting

Para a determinação da expressão de AKT fosforilada (pAKT) em neutrófilos estimulados com ADAM-9D, foi utilizada a técnica de wetsernblotting. Após a estimulação dos neutrófilos ( $5 \times 10^6$  células/mL em RPMI), estas foram centrifugadas e imediatamente lisadas com 100  $\mu$ L de tampão de lise fervente (1% SDS, 1 mM ortovanadato, 10 mM Tris, pH 7,4). Os lisados foram fervidos por 3 minutos, sonicados e novamente fervidos por mais 3 minutos. Amostras de 5  $\mu$ L foram diluídas 1:10 e utilizadas para quantificação de proteína pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Às amostras foi adicionado o tampão de amostra (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, SDS 1%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, glicerol 10%, azul de bromofenol, 0,001%) e fervidas novamente por 3 minutos. Amostras (30  $\mu$ g de proteína) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida de 10% SDS-PAGE (150 V, 25 mA por 90 minutos) e posteriormente transferidas para membranas de PVDF (Amersham Biosciences) por eletrotransfência (15 V, 328 mA por 1 hora). A eficiência da transferência foi avaliada pela coloração da membrana como vermelho de Ponceau. Após a lavagem em água para retirada do corante, a membrana foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente com solução de bloqueio contendo BSA 5%, Tween-20 0,5% em PBS (T-PBS). Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo primário de coelho anti-pAKT humana diluído 1:1000 em T-PBS contendo BSA 2%. Após a incubação, as membranas foram extensivamente lavadas com T-PBS e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho conjugados a HRP (diluídos 1:10000 em T-PBS BSA 2%) por 2 horas. As membranas foram então lavadas (3 vezes por 10 minutos), secas e incubadas com solução de quimioluminescência. As bandas imunorreativas foram visualizadas por exposição das membranas em filmes radiográficos. 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 AKT total, usada como controle do experimento.

### 3.9 Tratamento estatístico

Os resultados obtidos são expressos como média e desvio padrão da média. Os dados foram analisados por ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni, com auxílio do programa GraphPad Prism 4 para Windows. Foram consideradas significativas diferenças onde  $P < 0.05$ .



Figura 9 - Purificação de neutrófilos humanos através de gradiente descontinuo de Percoll

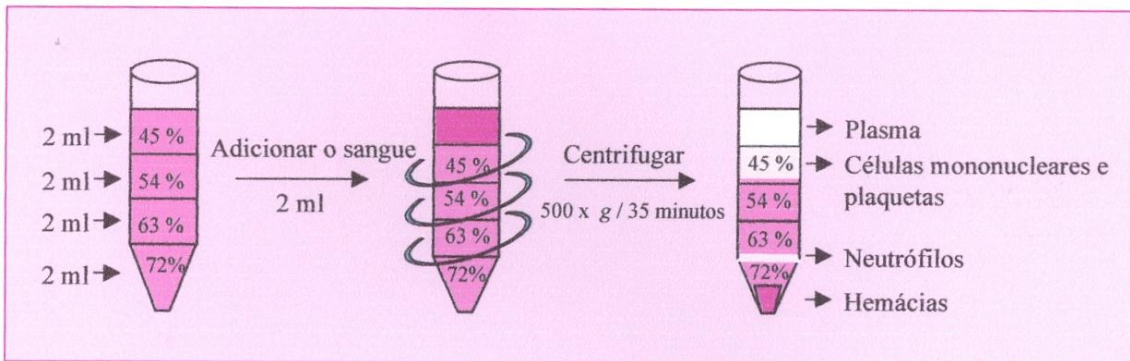
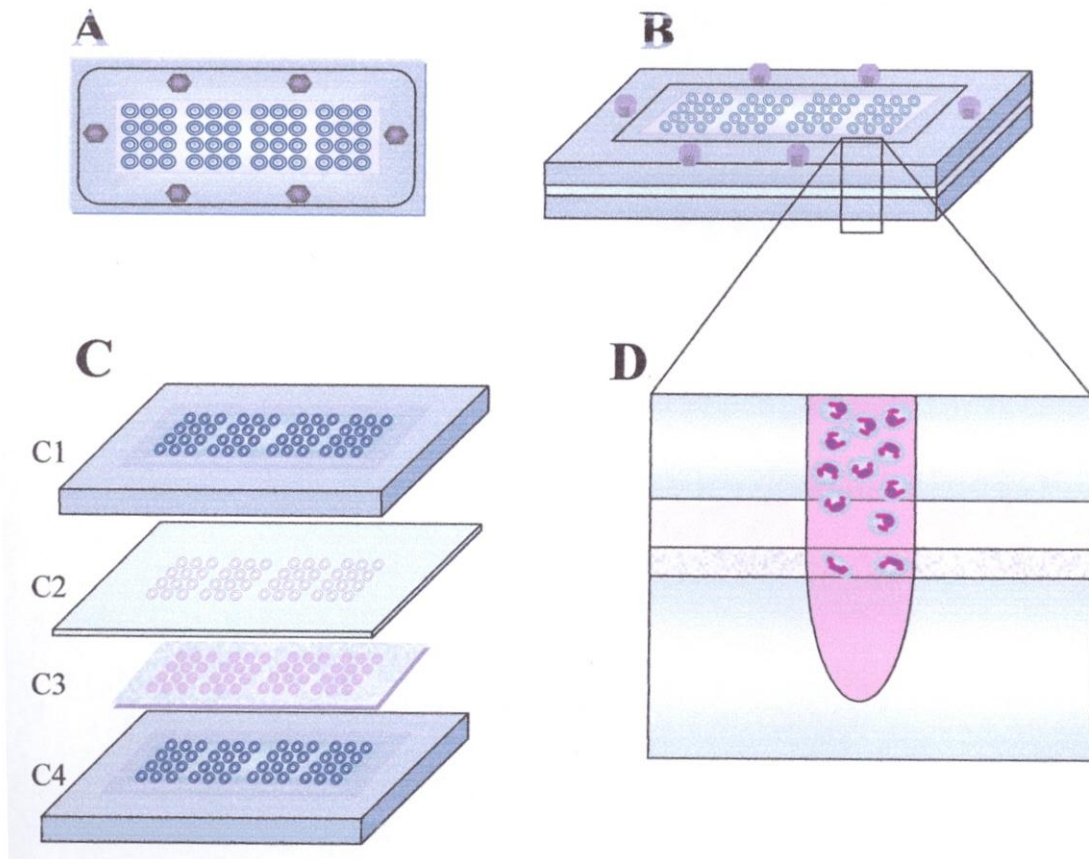


Figura 10 - Desenho esquemático da câmara de Boyden modificada



Legenda: A) vista superior; (B) vista lateral; (C) C1: parte superior da câmara, C2: membrana protetora de polietileno, C3: membrana de policarbonato, C4: parte inferior da câmara; (D) detalhe da câmara.

## 4 RESULTADOS

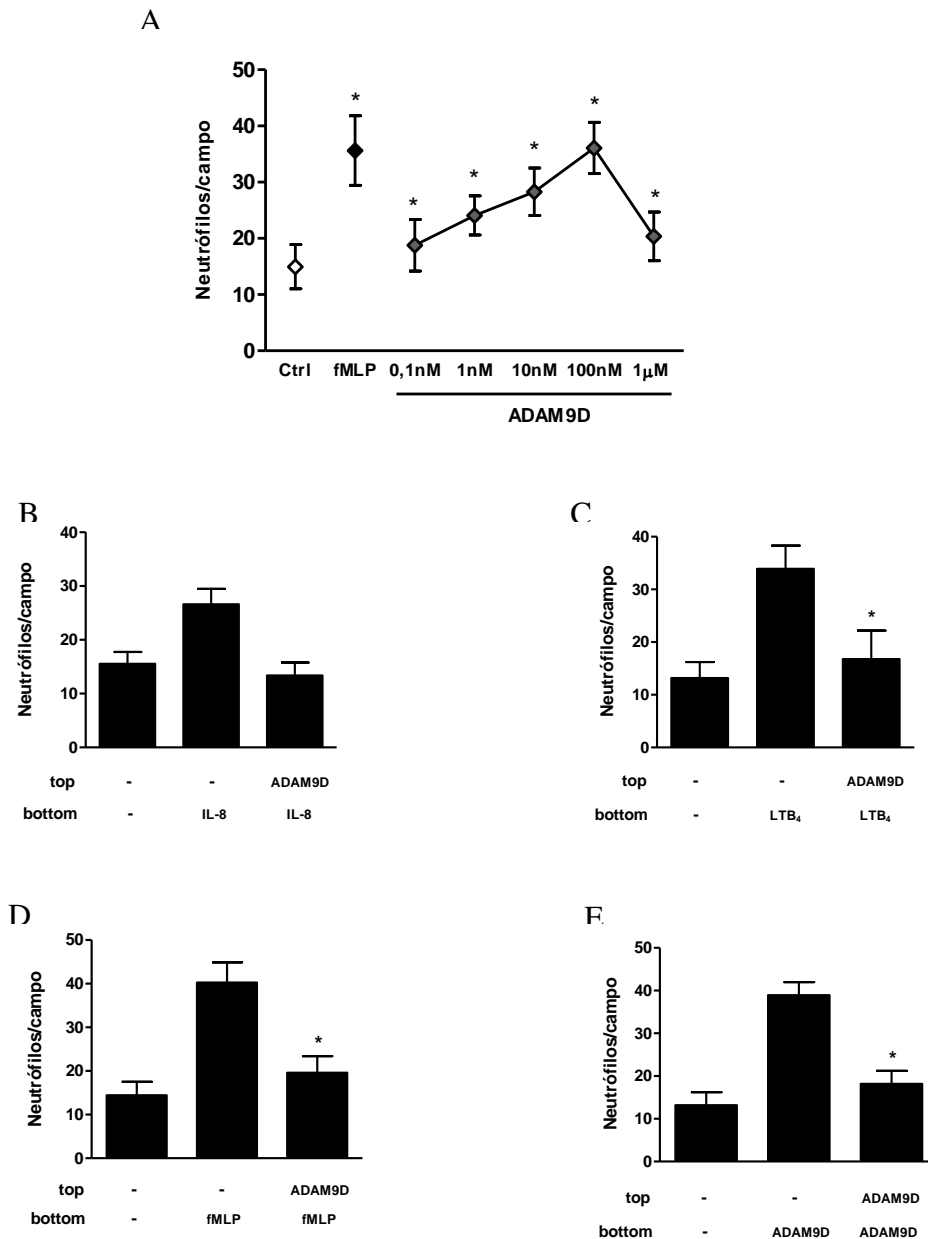
### 4.1 Efeito da ADAM9D sobre a resposta quimiotática de neutrófilos humanos

Inicialmente, procuramos investigar os possíveis efeitos da ADAM9D sobre parâmetros de ativação em neutrófilos. A capacidade migratória de neutrófilos em resposta a doses crescentes de ADAM9D foi avaliada em câmara de Boyden. Nossos resultados indicam que o domínio desintegrina da ADAM9 foi capaz de induzir o recrutamento de neutrófilos de modo similar ao fMLP, nosso controle positivo (Figura 11, painel A). Além disso, este fenômeno mostrou ser dose dependente. Conforme aumentamos a concentração de ADAM9D, observamos uma pontenciação da resposta migratória de neutrófilos. Contudo, doses maiores de ADAM9D (1  $\mu$ M) não foram capazes de induzir a migração das células. Este tipo de resposta que acarreta a na representação gráfica uma curva “forma de sino” é também observada no recrutamento de neutrófilos em resposta a estímulos quimiotáticos clássicos, como fMLP e IL-8, sugerindo que o domínio desintegrina da ADAM-9D possui uma atividade quimiotática para essas células. Paralelamente, neutrófilos foram tratados com ADAM9D em sua concentração quimiotática ótima (100 nM) e colocadas para migrar em direção a IL-8, LTB<sub>4</sub>, fMLP e a própria ADAM9D. Como mostrado na Figura 11 (painéis B, C, D e E, respectivamente), neutrófilos estimulados com ADAM9D apresentaram um profundo comprometimento da resposta migratória, sugerindo a ocorrência de dessensibilização tanto homóloga, quanto heteróloga associados ao efeito quimiotático.

### 4.2 Efeito da ADAM9D sobre a produção de EROs em neutrófilos humanos

Outro parâmetro de ativação de neutrófilos avaliado foi a produção de EROs. A geração de espécies reativas é um importante mecanismo microbicida utilizado por células imunológicas para eliminar microrganismos invasores durante a resposta inflamatória. Além disso, as espécies reativas podem desempenhar papel de segundos

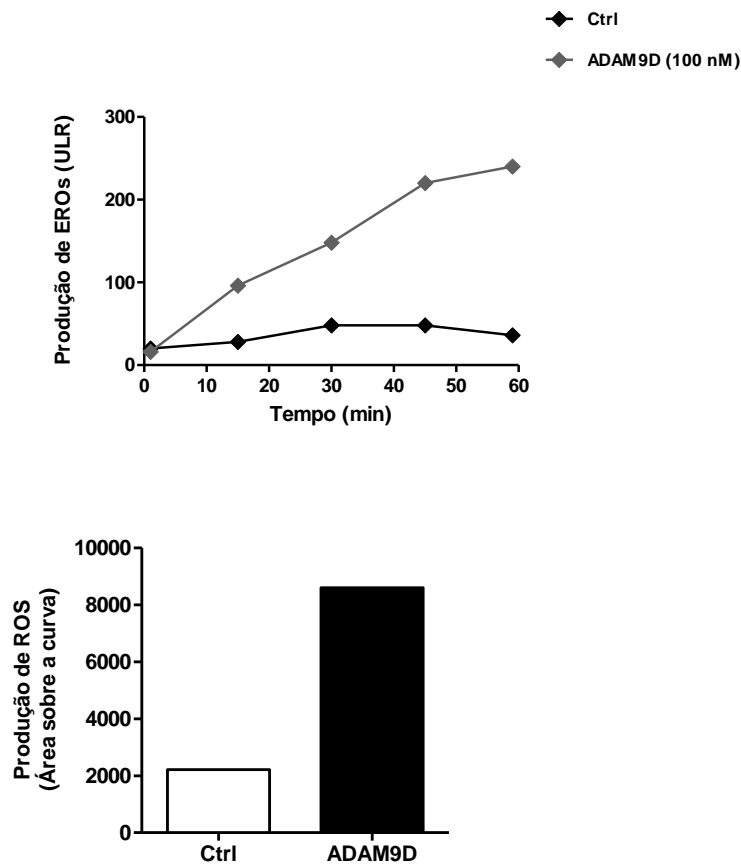
Figura 11 - Efeito da ADAM9D sobre a resposta quimiotática de neutrófilos humanos



Legenda: A capacidade migração de células recém isoladas ( $10^6$  neutrófilos/mL) em resposta a doses crescentes de ADAM9D (0,1 nM – 1  $\mu$ M) foi avaliada em câmara de Boyden por 60 minutos a 37°C (A). As células ( $10^6$  neutrófilos) foram incubadas com ADAM9D (100 nM) e a capacidade migratória dos neutrófilos foi avaliada em câmara de Boyden em resposta a estímulos quimiotáticos clássicos como IL-8 (30 nM, painel B), LTB<sub>4</sub> (100 nM, painel C), fMLP ( $10^{-7}$  M, painel D) e a própria ADAM9D (100 nM, painel E) por 60 minutos a 37°C. Os dados representam a média  $\pm$  D.P. do número de neutrófilos por campo, contados em microscopia ótica em aumento de 1000x. Os dados foram obtidos de 3 experimentos independentes. \* indica diferença significativa em relação aos neutrófilos migrando em direção ao estímulo (controle positivo).

mensageiros ao ativarem vias de sinalização envolvidas em uma variedade de processos celulares. As células recém isoladas foram estimuladas com a ADAM9D e, em seguida, incubadas com luminol. A produção de EROs foi avaliada pela quimioluminescência produzida através da oxidação de luminol durante um período de 60 minutos de incubação. Como observado anteriormente em outros experimentos, o tratamento de neutrófilos com o domínio desintegrina da ADAM9 foi capaz de induzir a produção de EROs, quando comparados ao grupo não estimulado. O PMA foi utilizado como controle positivo para a produção de EROs (dado não mostrado).

Figura 12 - Efeito da ADAM9D sobre a produção de EROs em neutrófilos humanos



Legenda: As células ( $2 \times 10^5$ ) recém isoladas foram estimuladas ou não com ADAM9D e a produção de EROs foi determinada em um ensaio de quimioluminescência dependente de luminol pela incubação de neutrófilos com luminol por 60 minutos. Os valores foram expressos em unidade de luminescência relativa sobre diferentes tempos (painel esquerdo) e área sobre a curva (painel direito). Os dados foram obtidos de um experimento.

#### 4.3 Efeito da inibição da apoptose de neutrófilos humanos estimulados com ADAM9D

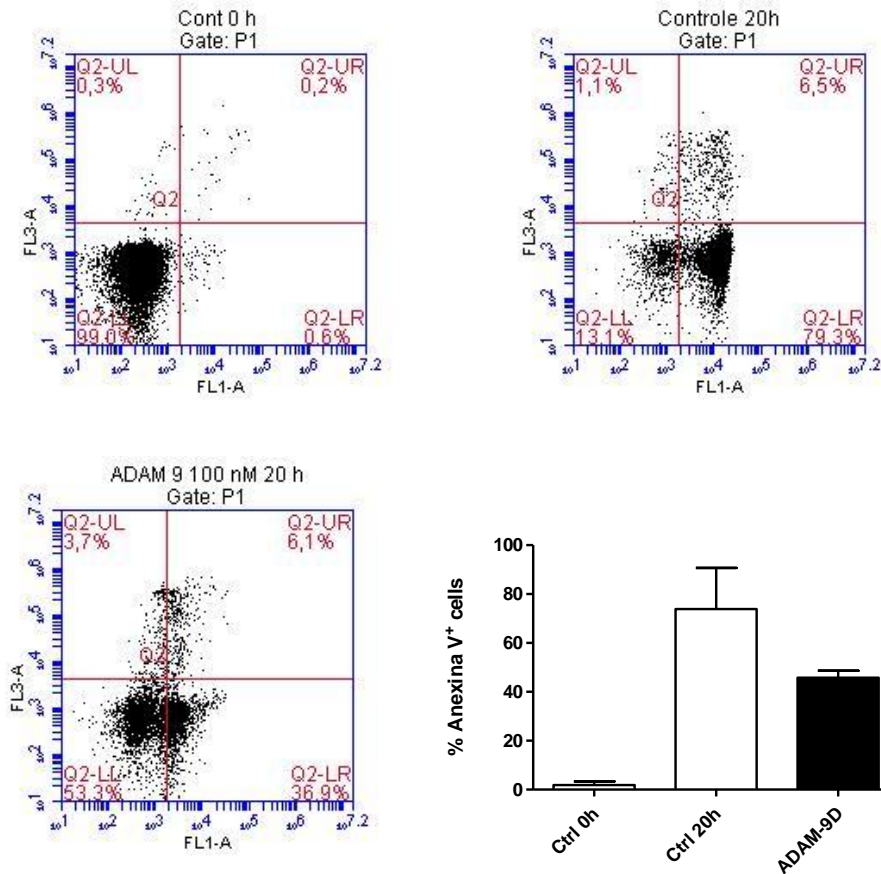
Neutrófilos são dotados de grande potencial citotóxico, portanto, a funcionalidade destas células imunológicas é regulada por mecanismos sofisticados com a finalidade de evitar prejuízos a tecidos e órgãos. Após a eliminação dos microrganismos invasores, os neutrófilos ativam vias de sinalização que culminam na apoptose destas células. Para a determinação da apoptose de neutrófilos, as células foram incubadas em meio suplementado com 10% soro fetal bovino na presença ou na ausência de ADAM9D por 20 horas. Após a incubação, a apoptose de neutrófilos foi então avaliada por citometria de fluxo através da dupla marcação das células com Anexina V e iodeto de propídio. Como esperado, após esse tempo, 70-80% de neutrófilos não estimulados entraram em apoptose (Figura 13). Por outro lado, o tratamento de neutrófilos com a ADAM9D foi capaz de inibir a apoptose destas células (40-50%), quando comparados ao grupo não tratado. Estes dados, em conjunto com os resultados obtidos nos experimentos anteriores, sugerem que o domínio desintegrina da ADAM9 é capaz de modular positivamente as funções de neutrófilos.

#### 4.4 Envolvimento das integrinas $\alpha_5\beta_1$ , $\alpha_9\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ na migração de neutrófilos humanos induzida pela ADAM-9D.

Levando-se em consideração que desintegrinas isoladas do veneno de serpentes são capazes de interagir com integrinas expressas em diferentes tipos celulares e que as ADAM compartilham similaridades com estas desintegrinas, procuramos investigar os tipos de integrinas envolvidas no processo quimiotático de neutrófilos em resposta ao domínio desintegrina da ADAM9. Nossos resultados mostram que neutrófilos tratados com anticorpo contra as subunidades  $\alpha_5$  e  $\alpha_v$  apresentaram um comprometimento da resposta migratória, quando comparados às células sem tratamento (Figura 14, painéis A e B respectivamente). O mesmo fenômeno foi observado em células tratadas com anticorpos para a integrina  $\alpha_9\beta_1$  (Figura 14, painel C). Nossos resultados mostram, ainda, que neutrófilos pré-tratados permanecem responsivos a estímulos quimiotáticos, excluindo a possibilidade de ativação das

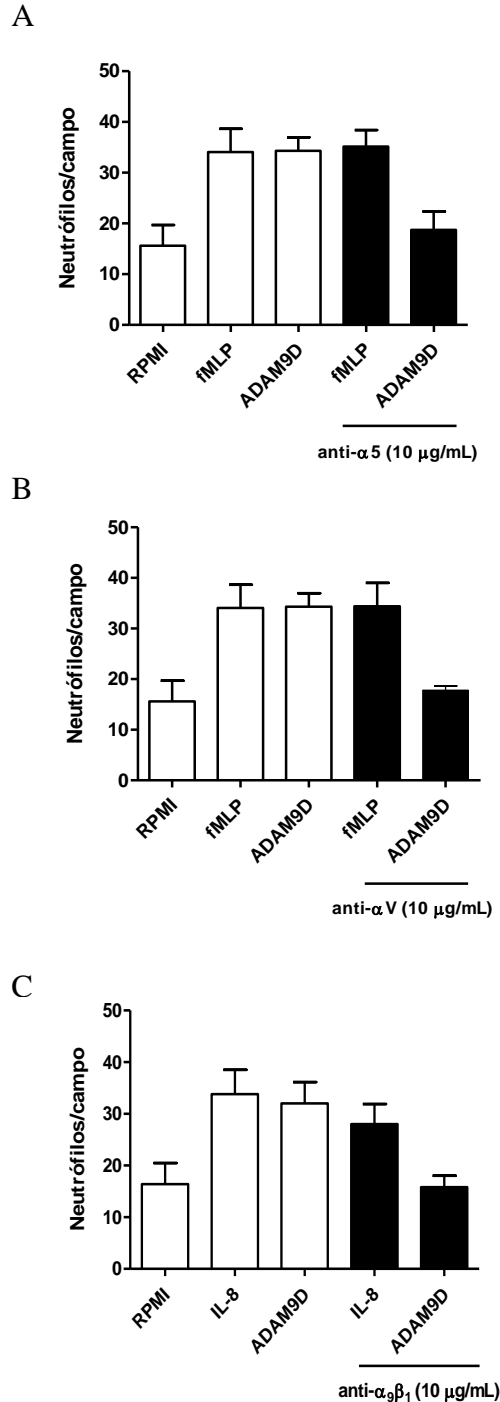
células pelos anticorpos. Com base nestes dados, podemos sugerir que a participação destas integrinas para o processo quimiotático é de vital importância.

Figura 13 - Efeito da inibição da apoptose de neutrófilos humanos estimulados com ADAM9D



Legenda: As células ( $10^6$  neutrófilos) foram incubados por 20 horas a  $37^\circ\text{C}$  com ADAM9D (100 nM) ou mantidos em meio (RPMI). Após o tempo de incubação, os neutrófilos foram lavados com tampão de ligação e marcados com Anexina V conjugada a FITC (1:500) por 20 minutos em temperatura ambiente. As células foram então marcadas com PI (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e imediatamente adquiridas no citômetro de fluxo. A dupla marcação foi expressa em quadrantes e o gráfico representa a percentagem de células marcadas para a anexina V. Os dados foram obtidos de dois experimentos independentes.

Figura 14 - Envolvimento das integrinas  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_9\beta_1$  e  $\alpha_v\beta_3$  na migração de neutrófilos humanos induzida pela ADAM9D



Legenda: As células ( $10^6$  neutrófilos/mL) foram pré-tratadas ou não por 5 minutos a  $37^\circ\text{C}$  com anticorpos neutralizantes para a integrina  $\alpha_9\beta_1$  (A), a subunidade  $\alpha_5$  (B) ou para a subunidade  $\alpha_v$  (C). As células foram então analisadas para quimiotaxia em resposta ao fMLP ( $10^{-7}$  M) ou ADAM9D (100 nM) em câmara de Boyden. Os gráficos representam a média  $\pm$  D.P. do número de neutrófilos por campo, contados em microscopia ótica. Os dados foram obtidos de dois experimentos independentes.

#### **4.5 Participação da via da PI3K na migração de neutrófilos humanos em resposta a ADAM9D**

Nosso grupo demonstrou recentemente que a VLO5, uma desintegrina ligante de inetrgrina  $\alpha_9\beta_1$  isolada de venenos de serpente, é capaz de promover a migração de neutrófilos através de vias de sinalização dependentes de PI3K. Além disso, existem fortes evidências de que ADAM9D é capaz de ativar a via da p38 MAPK (Karadag e col., 2006). Segundo a literatura, estas proteínas também parecem essenciais na ativação de diferentes mecanismos de sinalização relacionados com a migração celular (Heit e col., 2008). Com base nestes relatos, procuramos investigar as vias de sinalização que são ativadas pelo domínio desintegrina da ADAM9 durante o recrutamento de neutrófilos. O tratamento das células com LY294002, um inibidor farmacológico para PI3K, resultou na supressão da resposta migratória destas células (Figura 15, painel A). Resultados similares foram obtidos em neutrófilos tratados com Wortmanina, outro inibidor de PI3K (Figura 15, painel B). O mesmo fenômeno, no entanto, não foi observado em neutrófilos tratados com inibidor de p38, SB203580 (Figura 15, painel C). Estas evidências, em conjunto, sugerem que a migração de neutrófilos mediado pela ADAM9D requer o envolvimento de vias de sinalização ativadas pela PI3K.

#### **4.6 O efeito quimiotático da ADAM9D depende da ativação de CXCR2**

A migração de neutrófilos é um processo celular essencial para uma resposta imunológica eficiente. Este processo é mediado, em grande parte, por uma importante família de receptores quimiotáticos, os GPCRs. Dentre os receptores que compõem esta família, o CXCR2 tem seu merecido destaque. Disfunções neste receptor estão intimamente associadas a uma falência da migração de neutrófilos que contribui para o aumento da susceptibilidade às infecções. Com base nestas evidências, avaliamos uma possível contribuição de CXCR2 no recrutamento de neutrófilos induzido pela ADAM9D. As células tratadas com toxina pertussis (PTx), um inibidor de proteína  $G_i$ , apresentaram um profundo comprometimento da migração em resposta ao domínio desintegrina, quando comparados ao grupo sem tratamento (controle positivo), sugerindo em aparente envolvimento desta família de receptores no efeito

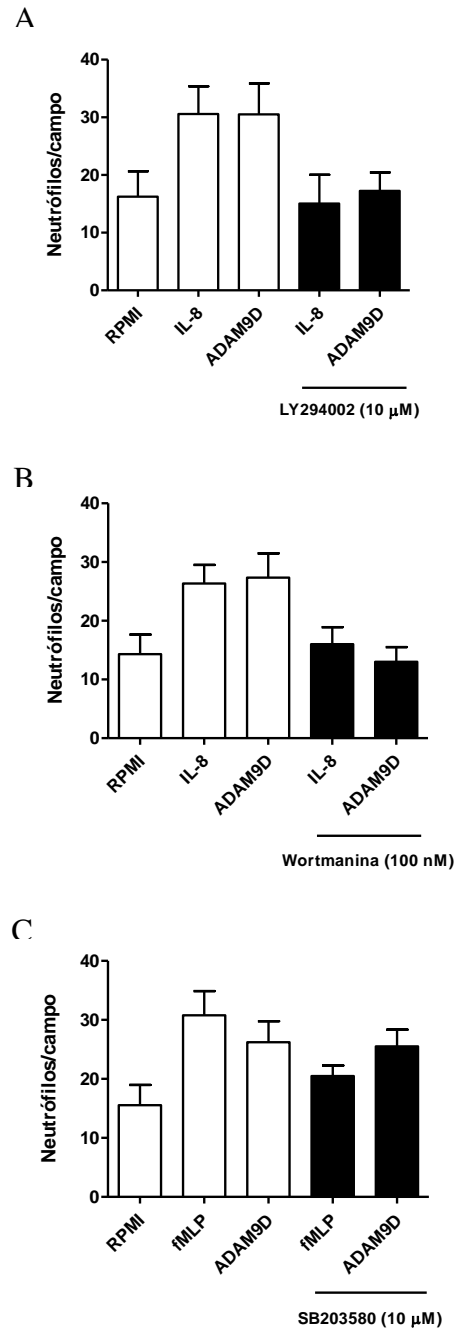


quimiotático da ADAM9D (Figura 16, painel A). Como esperado, a migração de neutrófilos em resposta aos mediadores clássicos, IL-8 ou fMLP, também foi drasticamente afetada na presença da toxina. Em experimentos paralelos, mostramos que a utilização de dois inibidores para o receptor CXCR2, a repertaxina (RPTX) e o SB225002, também resultou em uma falência da resposta migratória à ADAM9D (Figura 16, painéis B e C, respectivamente). O processo quimiotático de neutrófilos é classicamente regulado pela via da PI3K/AKT. Confirmando este relato, a estimulação de neutrófilos com o domínio desintegrina induziu a fosforilação de AKT, após 1 hora de tratamento. Em adição, neutrófilos pré-tratados com repertaxina e posteriormente estimulados com ADAM9D apresentaram uma diminuição na expressão de pAKT (Figura 17), em comparação ao grupo sem tratamento, sugerindo que a ativação de CXCR2 seria essencial para o recrutamento de neutrófilos induzidos pelo domínio desintegrina da ADAM9.

#### **4.7 Efeito da inibição da apoptose de neutrófilos humanos estimulados com ADAM-9D depende da ativação de CXCR2**

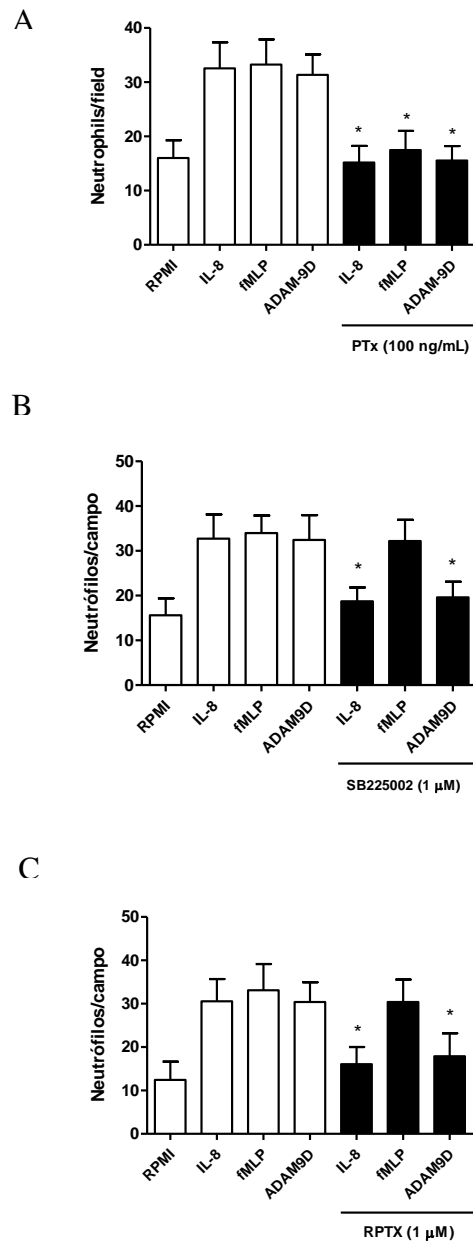
Como observamos anteriormente a contribuição de CXCR2 no efeito da ADAM9D sobre a migração celular e as vias de transdução de sinal ativadas por este receptor também estão envolvidos em outros fenômenos importantes como a sobrevivência celular, procuramos avaliar o papel desempenhado pelo CXCR2 no efeito anti-apoptótico de ADAM9D em neutrófilos humanos. Esta questão foi abordada, utilizando dois ensaios que analisam diferentes parâmetros de apoptose. A marcação com Anexina V conjugada a FITC demonstrou que a estimulação das células com ADAM9D inibiu o apoptose, corroborando com os resultados já obtidos (Figura 13). Este processo, no entanto, foi revertido pelo pré-tratamento dos neutrófilos com SB225002 (Figura 18, painel superior). Resultados similares foram observados na diferença de potencial de membrana em células pré-tratadas com repertaxina (Figura 18, painel inferior). O pré-tratamento de neutrófilos com repertaxina reverteu significativamente o efeito protetor da ADAM9D sobre a perda do potencial de membrana durante a apoptose espontânea das células (Figura 19).

Figura 15 - Participação da via da PI3K na migração de neutrófilos humanos em resposta a ADAM9D



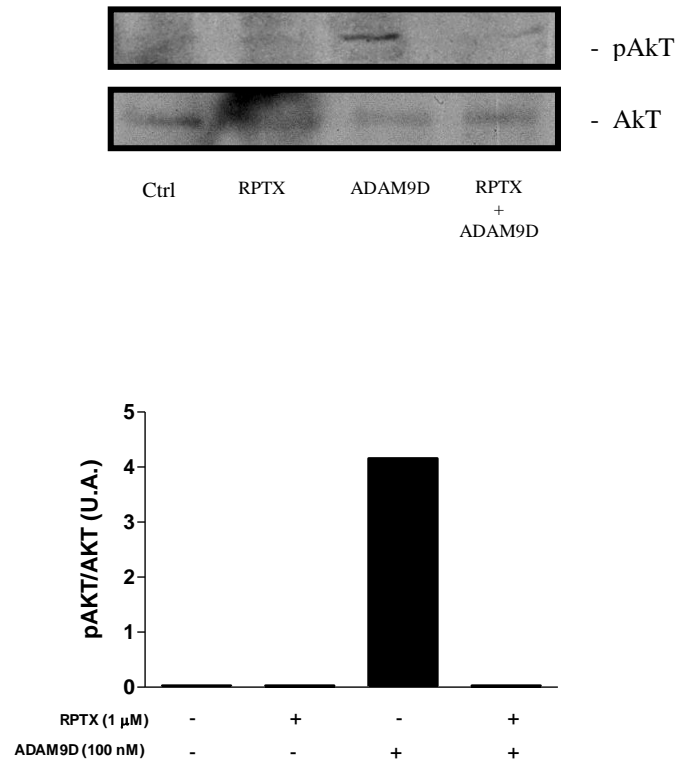
Legenda: As células ( $10^6$  neutrófilos/mL) foram incubadas na presença ou na ausência por 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$  com LY294002, um inibidor seletivo de PI3K (A), com Wortmanina, outro inibidor de PI3K (B), ou com SB203580, um inibidor seletivo de p38 (C). As células foram então analisadas para quimiotaxia em resposta a IL-8 (30 nM), fMLP ( $10^{-7}$  M), ou ADAM9D (100 nM) em câmara de Boyden. Os gráficos representam a média  $\pm$  D.P. do número de neutrófilos por campo, contados em microscopia ótica. Os dados foram obtidos de dois experimentos independentes.

Figura 16 - O efeito quimiotático induzido pela ADAM9D depende da ativação de CXCR2



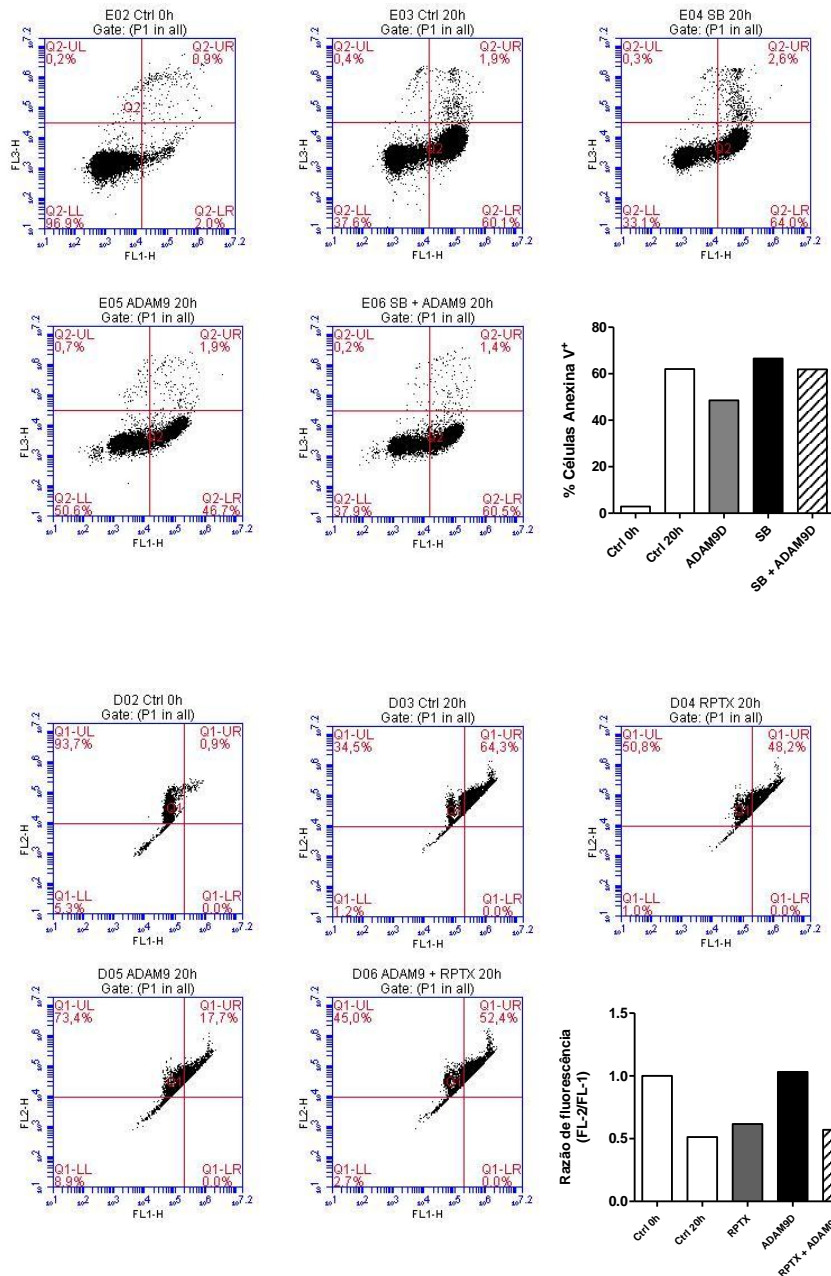
Legenda: As células ( $10^6$  neutrófilos/mL) foram incubadas na presença ou na ausência por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  com toxina pertussis (PTx, 100 ng/mL), um inibidor de GPCRs (A), 30 minutos com SB225002 (1  $\mu\text{M}$ ), um inibidor seletivo para CXCR2 (B), ou por 15 minutos com RPTX (1  $\mu\text{M}$ ), um inibidor alostérico de CXCR2(C). As células foram então analisadas para quimiotaxia em resposta a IL-8 (30 nM), fMLP ( $10^{-7}$  M), ou ADAM9D (100 nM) em câmara de Boyden. Os gráficos representam a média  $\pm$  D.P. do número de neutrófilos por campo, contados em microscopia ótica. Os dados foram obtidos de 3 experimentos independentes. \* indica diferença significativa em relação aos neutrófilos migrando em direção ao estímulo (controle positivo).

Figura 17 - Efeito do pré-tratamento de neutrófilos humanos com inibidor de CXCR2 sobre a ativação da via PI3K/Akt



Legenda: Neutrófilos humanos ( $5 \times 10^6$  células) recém isolados foram pré-tratados 15 minutos com repertaxina ( $5 \mu\text{M}$ ). Em seguida, as células foram incubadas por 1 hora com ADAM9D ( $500 \text{ nM}$ ) ou mantidas em meio. As células foram então analisadas por westernblotting para avaliar a expressão de pAkt. As imagens são derivadas de um experimento e mostram o efeito da repertaxina sobre a expressão de pAkt induzida pela ADAM9D.

Figura 18 - Efeito da inibição da apoptose de neutrófilos humanos estimulados com ADAM9D depende da ativação de CXCR2.



Legenda: As células ( $10^6$  neutrófilos) foram pré-tratadas ou não por 30 minutos com SB203580 ( $1 \mu\text{M}$ ) ou com repertaxina (RPTX,  $1 \mu\text{M}$ ), por 15 minutos. Em seguida, os neutrófilos foram incubados por 20 horas a  $37^\circ\text{C}$  com ADAM9D ( $100 \text{ nM}$ ) ou mantidos em meio (RPMI). Após o tempo de incubação, os neutrófilos foram lavados com tampão de ligação e marcados com anexina V conjugada a FITC (1:500) e com PI ( $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou com JC-1 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), e adquiridas no citômetro de fluxo. A dupla marcação foi expressa em quadrantes e o gráfico representa a percentagem de células marcadas para a anexinaV (painel superior) ou a razão entre as fluorescências vermelha e verde (painel inferior). Os dados foram obtidos de um experiment

## 5 DISCUSSÃO

A infiltração da massa tumoral por diferentes tipos de leucócitos e a contribuição destes para o desenvolvimento de tumores tem sido grande fonte de debates na literatura (Vesely e col., 2011). Inicialmente, acreditava-se que os leucócitos contribuíam para a diminuição da massa tumoral, devido às capacidades que as células do sistema imunológico possuem em reconhecer, apresentar e montar uma resposta eficiente aos antígenos expressos pelas células transformadas que compõem o tumor (Schreiber e col., 2011).

Estudos mais recentes, no entanto, sugerem que as células do sistema imunológico contribuem para a progressão do tumor. Alguns tipos de tumor são capazes de produzir um ambiente anti-inflamatório, no qual a resposta imunológica é drasticamente comprometida (Schreiber e col., 2011). Além disso, este ambiente gerado pelas células tumorais promove a polarização de leucócitos para um perfil imunossupressor e pró-angiogênico, o qual contribui para a progressão de tumores. Alguns mediadores produzidos pelas células tumorais, como o TGF- $\beta$ , participam deste processo de polarização, o que as tornam alvos terapêuticos em potencial. De fato, dados da literatura mostram que o tratamento de animais com antagonistas dos receptores de TGF- $\beta$  foi capaz de proteger os neutrófilos dos efeitos negativos promovidos por este mediador, contribuindo para a redução da massa tumoral (Frindlender e col., 2009). Contudo, as estratégias utilizadas para bloquear a ação destes mediadores resultaram em efeitos adversos nos tecidos normais, destacando a necessidade de estudos mais aprofundados sobre os mecanismos ativados pelas células tumorais.

Neste cenário complexo, as ADAM aparecem como valiosas ferramentas de estudo. Esta família de proteínas transmembrana desempenha um papel fundamental em importantes processos celulares (Estrella e col., 2009). Por outro lado, a expressão alterada de ADAM está intimamente associada com a formação e progressão de diversas patologias. Em concordância, a expressão exacerbada de ADAM9 em células malignas, por exemplo, está correlacionada com o desenvolvimento de tumores (Fritzsche e col., 2008). Uma série de trabalhos tem-se focado na participação do domínio metaloprotease da ADAM9 em inúmeros processos celulares, ao passo que os efeitos promovidos pelo domínio desintegrina ainda é pouco discutido. Nosso grupo demonstrou recentemente que desintegrinas isoladas do veneno de serpentes interagem com as integrinas expressas em neutrófilos, modulando diferentes funções celulares (Saldanha-Gama e col., 2010). Paralelamente, estudos sugerem que o domínio desintegrina da ADAM9 é capaz de induzir a migração de queratinócitos (Zigrino e

col., 2007). Estas evidências somadas aos poucos estudos que abordam os efeitos do domínio desintegrina das ADAM nos possibilitou formular a hipótese de um possível papel modulador desempenhado pela ADAM9D sobre a ativação de neutrófilos.

Esta questão foi abordada através de um modelo experimental, no qual neutrófilos humanos recém isolados foram estimuladas com ADAM9D e utilizados em ensaios, cujo objetivo fora avaliar os parâmetros de ativação celular. Inicialmente, investigamos a capacidade migratória de neutrófilos em resposta a doses crescentes de ADAM9D e observamos que estas células não só migraram em direção ao domínio desintegrina, como este processo mostrou ser dose dependente, característica também observada em mediadores quimiotáticos clássicos. Em experimentos paralelos, o tratamento das células com concentração ótima de ADAM9D, tornou-as menos responsivas a estímulos quimiotáticos como IL-8, LTB<sub>4</sub>, fMLP e a própria ADAM9D.

A ativação de neutrófilos por mediadores de natureza endógena ou exógena resulta também no aumento da sobrevivência celular e na geração de espécies reativas, permitindo que estas células alcancem o sítio da inflamação e eliminem os microrganismos invasores. Seguindo este racional, observamos um aumento na produção de EROs e a inibição da apoptose em neutrófilos estimulados com a ADAM9D. Em conjunto, estas evidências indicam que o domínio desintegrina presente nesta proteína é capaz de modular positivamente as funções efetoras de neutrófilos.

Neste trabalho, observamos ainda que a participação das integrinas  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_9\beta_1$  e  $\alpha_V\beta_3$  na ativação do processo migratório induzido pela ADAM9D parece necessária, uma vez que o tratamento de neutrófilos com anticorpos neutralizantes para estas integrinas resultou em um comprometimento da resposta migratória. Este resultado indica que o efeito quimiotático promovido pelo domínio desintegrina da ADAM9 depende de interações com as integrinas. É importante ressaltar que o reconhecimento de uma variedade de proteínas pelas integrinas requer a presença de uma seqüência específica de aminoácidos (RGD) na estrutura destes ligantes (Xiong e col., 2002). Os domínios desintegrina das ADAM, diferentemente das proteínas de matriz e de muitas desintegrinas encontradas em veneno de serpentes, não apresentam a seqüência RGD. A dependência deste tripeptídeo para o reconhecimento de integrinas abre um questionamento sobre a dinâmica do processo que observamos. Contudo, existem relatos na literatura de que os domínios desintegrina das ADAM compartilham os mesmos resíduos conservados de cisteína encontrados em algumas desintegrinas de veneno de serpentes. Além disso, algumas destas desintegrinas não apresentam a seqüência clássica

RGD, embora sejam capazes de modular as funções das integrinas (Mariano-Oliveira e col. 2003; Calvete e col., 2005). Neste consenso, cogitamos a possibilidade da ADAM9D interagir com as integrinas de neutrófilos. Em concordância com nossa hipótese, Karadag e colaboradores verificaram recentemente que ADAM9, altamente expressa em mieloma, ativa integrinas  $\alpha_v\beta_5$  presentes em osteoblastos através de seu domínio desintegrina, induzindo a produção de IL-6 por estas células (Karadag e col., 2006). Outros estudos indicam que, além de serem reconhecidas pela integrina  $\alpha_v\beta_5$ , as ADAM9D interagem com as integrinas  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_9\beta_1$  e  $\alpha_v\beta_3$ , as quais também são expressas em neutrófilos (Zigrino e col., 2010; Cominetti e col., 2009). A existência de tais evidências reforça os resultados obtidos em nosso modelo experimental.

Aprofundando nosso estudo, inibidores farmacológicos da PI3K (LY294002 e Wortmanina) e da p38 (SB203580) foram utilizados para investigar algumas das vias de sinalização ativadas durante o recrutamento de neutrófilos. As interações entre as integrinas e seus ligantes levam a ativação de diferentes mecanismos de transdução de sinal envolvidos em importantes processos celulares como a migração e a sobrevivência celular. A família da MAPK, bem como as isoformas da PI3K, são exemplos clássicos de proteínas que participam destes processos em diversos tipos celulares. A contribuição da PI3K no recrutamento de neutrófilos já foi demonstrada em estudos nos quais animais geneticamente deficientes para a subunidade  $p110\gamma$  apresentaram um profundo comprometimento da migração de neutrófilos (Hirsch e col., 2000). Alternativamente, a migração destas células em resposta a mediadores produzidos por microrganismos invasores, como o fMLP, envolve a ativação de vias de sinalização diferentes da IL-8, como a via da p38 MAPK. Embora os mecanismos quimiotáticos ativados por esta subfamília da MAPK permaneçam desconhecidos, existem evidências de que a via da p38 desempenha um papel crucial na migração de neutrófilos em resposta a estímulos exógenos (Heit e col., 2002; Heit e col., 2008).

Portanto, é intuitivo considerar que as vias de sinalização ativadas por estas proteínas participam da migração de neutrófilos modulada pela ADAM9D. Nossos resultados mostram que o tratamento das células com os inibidores da PI3K resultou na falência da resposta migratória, ao passo que este fenômeno não foi observado em células tratadas com o inibidor de p38. Com base nestes dados, sugerimos que a migração de neutrófilos mediada pelo domínio desintegrina da ADAM9 requer a ativação de vias de sinalização dependentes da PI3K, sem a participação da p38 neste fenômeno.



Prosseguindo nossos estudos moleculares, observamos que o tratamento de neutrófilos com toxina pertussis, um inibidor de proteína G inibitória, interferiu consideravelmente a capacidade migratória destas células em resposta ao domínio desintegrina. Este resultado nos levou a acreditar em um possível envolvimento de receptores quimiotáticos no processo de migração induzido pela ADAM9D.

Os receptores quimiotáticos desempenham um papel fundamental no recrutamento de células inatas para os tecidos lesionados. Durante os eventos iniciais da resposta inflamatória, as células endoteliais ativadas por citocinas inflamatórias produzem grande quantidades de mediadores quimiotáticos, em particular o IL-8, que ativam os neutrófilos circulantes. Esta quimiocina é reconhecida por dois importantes receptores quimiotáticos homólogos expressos em neutrófilos, os receptores CXCR1 e CXCR2 (Sarmiento e col., 2011). Enquanto os mecanismos ativados por CXCR1 ainda não foram bem elucidados, a contribuição de CXCR2 na migração de neutrófilos é freqüentemente retratada na literatura (Paula Neto e col., 2011). Foi tentador postular que este receptor estaria envolvido nos efeitos promovidos pelo domínio desintegrina da ADAM9.

Corroborando com esta hipótese, observamos que neutrófilos pré-tratados com os inibidores de CXCR2 apresentaram uma falência da migração em resposta a ADAM9D. Esses inibidores de CXCR2, repertaxina e o SB225002, embora não tivessem efeitos sobre a apoptose espontânea de neutrófilos, também reverteram o efeito protetor da ADAM9D sobre a perda do potencial de membrana mitocondrial e da exposição de fosfatidil serina decorrente da morte celular programada. Em adição, o pré-tratamento das células com repertaxina foi acompanhado por uma diminuição na fosforilação de AKT promovida pelo domínio desintegrina, sugerindo que a ativação da via PI3K/AKT, envolvida nos efeitos quimiotático e anti-apoptótico de neutrófilos humanos, seria modulada por receptores quimiotáticos em resposta as interações entre a ADAM9D e as integrinas.

Tomadas em conjunto, nossos dados sugerem a existência de um possível mecanismo de transativação entre as integrinas e os receptores quimiotáticos, o qual estaria envolvido nas respostas celulares de neutrófilos. Diversos trabalhos têm demonstrado que desintegrinas isoladas de veneno de serpentes e o domínio desintegrina das proteínas ADAM modulam as funções das células dos organismos através de interações com as integrinas (Karadag e col., 2006; Cominetti e col., 2009; Saldanha-Gama e col., 2010). Estes dados contrastam, pelo menos parte, com os resultados obtidos em nosso estudo, pois os efeitos observados até o momento não são atribuídos exclusivamente a ligação direta das integrinas com a ADAM9D.

A ativação de CXCR2 em neutrófilos parece ser um evento crucial para as respostas induzidas pelo domínio desintegrina. Os mecanismos moleculares que levam a ativação de CXCR2 pela integrinas, no entanto, não foram abordados neste estudo.

Nossos dados *in vitro* somados as evidências que apontam para o envolvimento do domínio desintegrina da ADAM9 na liberação de IL-6 em osteoblastos, permitem a formulação de um modelo no qual as interações entre ADAM9D e as integrinas expressas em neutrófilos levam a secreção de IL-8 ou de outros ligantes de CXCR2. A ligação destes mediadores quimiotáticos ao CXCR2 culminaria na ativação de vias de sinalização dependentes de PI3K e a conseqüente migração de neutrófilos. Segundo a literatura, estes mediadores protéicos são sintetizados a partir da ativação de fatores de transcrição em resposta a estímulos endógenos ou exógenos. A síntese protéica em eucariotos é um processo relativamente lento e que geralmente demanda horas para ocorrer. Além disso, não existem evidências de que mediadores inflamatórios recém sintetizados fiquem armazenados em vesículas ou organelas citoplasmáticas para posterior utilização.

Estes relatos contrariam os resultados obtidos em nosso estudo. Observamos que a incubação das células com ADAM9D pelo período de 1 hora foi capaz de induzir a fosforilação de Akt. Além disso, este fenômeno foi revertido pelo pré-tratamento das células com repertaxina, sinalizando um envolvimento de ligantes de CXCR2 na ativação de PI3K. Por outro lado, dada a característica de o neutrófilo ser uma célula preparada para respostas rápidas, é possível que a síntese protéica ocorra de forma mais rápida nestas células, permitindo aumentos detectáveis de proteínas em tempos relativamente curtos.

Outra explicação plausível para o fenômeno observado consiste na notável capacidade que os diferentes receptores celulares possuem em comunicarem entre si por meio de sinais intracelulares. É bem estabelecido na literatura que receptores quimiotáticos, bem como receptores para fatores de crescimento, quando ativados, são capazes de alterar o comportamento de integrinas, aumentando a afinidade destas proteínas pelos seus ligantes. A presença de tais mecanismos de transativação em diversos processos celulares nos permite especular a existência de uma via de sinalização de mão dupla, no qual as integrinas ativam a proteína G em resposta ao domínio desintegrina da ADAM9.

A via clássica de ativação das proteínas G depende de modificações conformacionais dos receptores associados. Em resposta, as proteínas G são recrutadas para regiões próximas ao receptor ativado e disparam inúmeras vias de sinalização que culminam em processos celulares importantes tais como migração e sobrevivência. A ocupação de CXCR2 pelos

antagonistas bloquearia estas modificações, inibindo o recrutamento e a ativação da proteína G. Conseqüentemente, as respostas celulares desencadeadas por esta proteína seriam drasticamente reduzidas.

Nosso estudo também permite especular que as células tumorais poderiam utilizar o domínio desintegrina da ADAM9 como um mecanismo alternativo para interagir com as células normais do organismo, especialmente leucócitos. A contribuição destas proteínas na progressão de tumores é amplamente discutida na literatura. Por serem dotadas de um domínio metaloprotease com atividade catalítica, as ADAM9 são capazes de degradar várias proteínas da matriz extracelular. Deste modo, as células tumorais conseguem se desprender do foco primário e invadir os tecidos adjacentes, processo conhecido como metástase. Além disso, já foi demonstrado que as ADAM9 atuam no processamento de fatores de crescimento e de citocinas que estão associados ao desenvolvimento de tumores.

Durante a metástase, a interação com os diferentes componentes de matriz e com as células adjacentes representam eventos importantes para o estabelecimento de tumores, pois permite que as células transformadas que compõe o tumor alcancem e colonizem os tecidos vizinhos. O domínio desintegrina das ADAM9 aparece como uma forma alternativa para o processo de adesão. Em concordância, Zigrino e colaboradores demonstraram que as interações entre melanomas e fibroblastos são mediadas, em grande parte, pela proteína ADAM9 (Zigrino e col., 2010).

Embora as proteínas ADAM9 sejam predominantemente expressas na superfície de células transformadas, formas solúveis foram detectadas recentemente (Mazzoca e col, 2005; Fry e Toker, 2010). O surgimento dessas novas evidências nos permite sugerir que as células tumorais, ao colonizarem um determinado órgão, secretam deliberadamente proteínas ADAM9, as quais seriam responsáveis por recrutar os neutrófilos circulantes para a massa tumoral através do domínio desintegrina. Uma vez alcançado o tumor, os neutrófilos se deparam com um microambiente repleto de mediadores imunossupressores que induzem a polarização destas células para um perfil anti-inflamatório, contribuindo para a progressão de tumores.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o presente momento mostram que o domínio desintegrina da proteína ADAM9 modula positivamente as respostas celulares em neutrófilos através das integrinas  $\alpha_9\beta_1$  e  $\alpha_V\beta_3$ . A ativação de vias de sinalização dependentes da PI3K está envolvida nas respostas celulares de neutrófilos. Além disso, o receptor quimiotático CXCR2 parece contribuir para os efeitos induzidos pela ADAM9D. Por fim, nossos dados sugerem a existência de um fenômeno de transativação entre as integrinas e o receptor quimiotático essencial para os processos de migração e sobrevivência celular em neutrófilos.

## REFERÊNCIAS

- Abadie V, Badell E, Douillard P, Ensergueix D, Leenen PJ, Tanguy M, *et al.* Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to draining lymph nodes. *Blood*. 2005 Sep 1; 106(5):1843-50.
- Almeida EA, Ilić D, Han Q, Hauck CR, Jin F, Kawakatsu H, *et al.* Matrix Survival signaling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH(2)-terminal kinase. *J Cell Biol*. 2000 May 1; 149(3):741-54.
- Alves-Filho JC, de Freitas A, Spiller F, Souto FO, Cunha FQ. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock*. 2008 Oct; 30 Suppl 1:3-9.
- 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.
- Bannenberg G, Arita M, Serhan CN. Endogenous Receptor Agonists: Resolving Inflammation. *The Scientific World Journal*. 2007 Sep 1; 7:1440-62.
- Bell JH, Herrera AH, Li Y, Walcheck B. Role of ADAM17 in the ectodomain shedding of TNF- $\alpha$  and its receptors by neutrophils and macrophages. *Journal Leukocyte Biology*. 2007 Jul; 82(1):173-6.
- Berton G, Lowell CA. Integrin signaling in neutrophils and macrophages. *Cell Signal*. 1999 Sep; 11(9):621-35.
- Beutler B. 2009. Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Immunol Rev*. 2009 Jan; 227(1):248-63.
- Black RA, White JM. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol*. 1998 Oct; 10(5):654-9
- Blobel CP. ADAMs: Key components in EGFR signaling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Jan; 6(1):32-43.
- Borissoff JL, Spronk HMH, Heeneman S, Cate HT. Is thrombin a key player in the "coagulation-atherogenesis" maze?. *Cardiovasc Res*. 2009 Jun 1; 82(3):392-403.

Bradford MM. *Anal Biochem.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. 1976 May 7; 72:248-54.

Bridges LC, Sheppard D, Bowditch, RD. ADAM disintegrin-like domain recognition by the lymphocyte integrins  $\alpha 4\beta 1$  and  $\alpha 4\beta 7$ . *Biochem J.* 2005 Apr 1; 387(Pt 1):101-8.

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.

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

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.

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.

Coelho AL, De Freitas MS, Mariano-Oliveira A, Oliveira-Carvalho AL, Zingali RB, Barja-Fidalgo C. Interaction of disintegrins with human neutrophils induces cytoskeleton reorganization, focal adhesion kinase activation, and extracellular-regulated kinase-2 nuclear translocation, interfering with the chemotactic function. *FASEB J.* 2001 Jul; 15(9):1643-5.

Cominetti MR, Martin AC, 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 Aug; 91(8):1045-52.

Costa FF, Verbisck NV, Salim AC, Ieradi DF, Pires LC, Sasahara RM, *et al.* Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. *Oncogene.* 2004 Feb 19; 23(7):1481-8.

Cotton M, Claing A. G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration. *Cellular Signaling.* 2009 Jul; 21(7):1045-53

Cowburn AS, Condliffe AM, Farahi N, Summers C, Chilvers ER. Advances in neutrophils biology: clinical implications. *Chest*. 2008 Sep; 134(3):606-12.

Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*. 2008 Aug 15; 112(4):935-45.

Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000 Jul 6; 343(1):37-49.

Duffy MJ, McKiernan E, O'Donovan N, McGowan PM. The role of ADAMs in disease pathophysiology. *Clin Chim Acta*. 2009 May; 403(1-2):31-6.

Estrella C, Rocks N, Paulissen G, Quesada-Calvo F, Noël A, Vilain E, *et al*. Role of A disintegrin and metalloprotease-12 in neutrophil recruitment induced by airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009 Oct; 41(4):449-58.

Ewan R, Huxley-Jones J, Mould AP, Humphries MJ, Robertson DL, Boot-Handford RP. 2005. The integrins of the urochordate *Ciona intestinalis* provide novel insights into the molecular evolution of the vertebrate integrin family. *BMC Evol Biol*. 2005 May 13; 5:31.

Filep JG, El Kebir D. 2009. Neutrophil apoptosis: a target for enhancing the inflammation resolution. *J Cell Biochem*. 2009 Dec 1; 108(5):1039-46.

Fischer OM, Hart S, Gschwind A, Ullrich A. EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem Soc Trans*. 2003 Dec; 31(Pt 6):1203-8.

Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limón P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat Rev Immunol*. 2010 Aug; 10(8):554-67.

Flinder LI, Timofeeva OA, Rosseland CM, Wireod L, Huitfeldt HS, Skarpen E. EGF-induced ERK-activation downstream of FAK requires rac1-NADPH oxidase. *J Cell Physiol*. 2011 Sep; 226(9):2267-78.

Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, *et al*. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*. 2009 Sep 8; 16(3):183-94.

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.

Fry JL, Toker A. 2010. Secreted and membrane-bound isoforms of protease ADAM9 have opposing effects on breast cancer cell migration. *Cancer Res*. 2010 Oct 15; 70(20):8187-98.

Geiszt M, Kopp JB, Várnai P, Leto TL. 2000. Identification of renox, an NAPH oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci*. 2000 Jul 5; 97(14):8010-4.

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.

Gilroy DW, Lawrence T, Perretti M, Rossi AG. Inflammatory resolution: Next opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 May; 3(5):401-16.

Gresham HD, Graham IL, Anderson DC, Brown EJ. Leukocyte adhesion-deficient neutrophils fail to amplify phagocytic function in response to stimulation. Evidence for CD11b/CD18-dependent and -independent mechanisms of phagocytosis. *J Clin Invest*. 1991 Aug; 88(2):588-97.

Guaiquil V, Swendeman S, Yoshida T, Chavala S, Campochiaro PA, Blobel CP. ADAM9 is involved in pathological retinal neovascularization. *Mol Cell Biol*. 2009 May; 29(10):2694-703.

Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Oct; 5(10):816-26.

Hehlgans S, Haase M, Cordes N. Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Jan; 1775(1):163-80.

Heit B, Liu L, Colarusso P, Puri KD, Kubes P. PI3K accelerates, but is not required for, neutrophil chemotaxis to fMLP. *J Cell Sci*. 2008 Jan 15; 121(Pt 2):205-14.

Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, *et al.* Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science*. 2000 Feb 11; 287(5455):1049-53.



Hotoda N, Koike H, Sasagawa N, Ishiura S. A secreted form of human ADAM9 has an alpha-secretase activity for APP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 May 3; 293(2):800-5.

Humphires MJ, Mcewan PA, Bartons SJ. Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. *Trends Biochem Sci.* 2003 Jun; 28(6):313-20.

Huovila AP, Almeida EA, White JM. ADAMs and cell fusion. *Curr Opin Cell Biol.* 1996 Oct; 8(5):692-9.

Hurnskainen MJ, Mcewan PA, Barton SJ, Buckley PA, Bella J, Mould AP. Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. *Trends Biochem Sci.* 2003 Jun; 28(6):313-20.

Hurst J, von Landenberg P. TLR and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2008 Jan; 7(3):204-8.

Hynes RO, Zhao Q. The evolution of cell adhesion. *J Cell Biol.* 2000 Jul 24; 150(2):F89-96.

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

Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK and p38 protein kinases. *Science.* 2002 Dec 6; 298(5600):1911-2.

Karadag A, Zhou M, Croucher PI. ADAM-9 (MDC-9/meltrin-gamma), a member of the a disintegrin and metalloproteinase family, regulates myeloma-cell-induced interleukin-6 production in osteoblasts by direct interaction with the alpha(v)beta5 integrin. *Blood.* 2006 Apr 15; 107(8):3271-8.

Kennedy AD, DeLeo FR. 2009. Neutrophil apoptosis and resolution of infection. *Immunol Res.* 2009; 43(1-3):25-61.

Kettritz R, Gaido ML, Haller H, Luft FC, Jennette CJ, Falk RJ. Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis of human neutrophils. *Kidney Int.* 1998 Jan; 53(1):84-91.

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.

Lafuste P, Sonnet C, Chazaud B., Dreyfus PA, Gherardi RK, Wewer UM, *et al.* ADAM12 and alpha9beta1 integrin are instrumental in human myogenic cell differentiation. *Mol Biol Cell.* Feb; 16(2):861-70.

Legate KR, Montañez E, Kudlacek O, Fässler R. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Jan; 7(1):20-31.

Levi M, van der Poll T. Two-way interactions between inflammation and coagulation. *Trends Cardiovasc Med.* 2005 Oct; 15(7):254-9.

Liddington RC, Ginsberg MH. Integrin activation takes shape. *J Cell Biol.* 2002 Sep 2;158(5):833-9.

Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell.* 1991 Jan 25; 64(2):327-36.

Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH. Integrin cytoplasmatic-domain binding proteins. *J Cell Sci.* 2000 Oct; 113 ( Pt 20):3563-71.

Lowell CA, Berton G. Integrin signal transduction in myeloid leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology.* 1999 Mar; 65(3):313-20.

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008 Jul 24; 454(7203):436-44.

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.

Mariano-Oliveira A, Coelho AL, Terruggi CH, Selistre-de-Araújo HS, Barja-Fidalgo C, De Freitas MS. Alternagin-C, a nonRGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. *Eur J Biochem.* 2003 Dec; 270(24):4799-808.

Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS, Yamada K. 1996. Integrins can collaborate with growth factor for phosphorylation of receptor tyrosin kinases and MAP kinase activation: role of integrin aggregation and occupancy receptors. *J Cell Biol.* 1996 Dec; 135(6 Pt 1):1633-42.

Moraes JA, Barcellos-de-Souza P, Silva SV, Assreuy J, Arruda MA, Barja-Fidalgo C. Heme modulates smooth muscle cell proliferation and migration via NADPH oxidase:

a counter-regulatory role for heme oxygenase system. *Atherosclerosis*. 2012 Oct; 224(2):394-400.

Moser M, Legate KR, Zent R, Fässler R. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science*. 2009 May 15; 324(5929):895-9.

Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev*. 2007 Oct; 219:88-102.

Niewiarowski S, McLane MA, Kloczewiak M, Stewart GJ. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. *Semin Hematol*. 1994 Oct; 31(4):289-300.

Novak U. ADAM proteins in the brain. *J Clin Neurosci*. 2004 Apr; 11(3):227-35.

O'Connor KL, Nguyen BK, Mercurio AM. RhoA function in lamellae formation and migration is regulated by the  $\alpha 6 \beta 4$  integrin and cAMP metabolism. *J Cell Biol*. 2000 Jan 24; 148(2):253-8.

Pan D, Rubin GM. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell*. 1997 Jul 25; 90(2):271-80.

Paula-Neto HA, Alves-Filho JC, Souto FO, Spiller F, Amêndola RS, Freitas A, *et al*. Inhibition of guanylyl cyclase restores neutrophil migration and maintains bactericidal activity increasing survival in sepsis. *Shock*. 2011 Jan; 35(1):17-27.

Peduto L, Reuter VE, Shaffer DR, Scher HI, Blobel CP. Critical function for ADAM9 in mouse prostate cancer. *Cancer Res*. 2005 Oct 15; 65(20):9312-9.

Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Sep; 3(9):639-50.

Premont RT, Gainetdinov RR. Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol*. 2007; 69:511-34.

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

Rock KL, Kono H. The Inflammatory Response to the Cell Death. *Annu Rev Pathol.* 2008; 3:99-126.

Roghani M, Becherer JD, Moss ML, Atherton RE, Erdjument-Bromage H, Arribas J, *et al.* Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J Biol Chem.* 1999 Feb 5; 274(6):3531-40.

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.

Sarmiento J, Shumate C, Suetomi K, Ravindran A, Villegas L, Rajarathnam K, *et al.* Diverging mechanisms of activation of chemokine receptors revealed by novel chemokine agonists. *PLoS One.* 2011; 6(12):e27967.

Schmid-Schönbein GW. Analysis of inflammation. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006; 8:93-131.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 2011 Mar 25; 331(6024):1565-70.

Schwartz MA. Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol.* 2001 Dec; 11(12):466-70.

Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* 2005 Dec; 6(12):1191-7.

Shen TL, Guan JL. Differential regulation of cell migration and cell cycle progression by FAK complexes with Src, PI3K, Grb7 and Grb2 in focal contacts. *FEBS Lett.* 2001 Jun 15; 499(1-2):176-81.

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.

Soehnlein O, Zernecke A, Eriksson EE, Rothfuchs AG, Pham CT, Herwald H, *et al.* Neutrophils secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood.* 2008 Aug 15; 112(4):1461-71.

Sun Y, Wang Y, Zhang J, Tao J, Wang C, Jing N, *et al.* ADAM23 plays multiple roles in neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells *Neurochem Res.* 2007 Jul; 32(7):1217-23.

Sun C, Wu MH, Guo M, Day ML, Lee ES, Yuan SY. ADAM15 regulates endothelial permeability and neutrophil migration via Src/ERK1/2 signalling. *Cardiovasc Res.* 2010 Jun 15; 87(2):348-55.

Sundaram MV. RTK/Ras/MAPK signaling. *WormBook.* 2006 Feb; 11:1-19.

Takada H, Imoto I, Tsuda H, Nakanishi Y, Ichikura T, Mochizuki H, *et al.* ADAM23, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in gastric cancers by homozygous deletion or aberrant promoter hypermethylation.

Thelen M, Stein JV. How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat Immunol.* 2008 Sep; 9(9):953-9. *Oncogene.* 2005 Dec 1; 24(54):8051-60.

Van Haastert PJM, Devreotes PN. Chemotaxis: signaling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Aug; 5(8):626-34.

Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB. Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Mar; 1123:134-45.

Verbisck NV, Costa ET, Costa FF, Cavalher FP, Costa MD, Muras A, *et al.* ADAM23 negatively modulates alpha(v)beta(3) integrin activation during metastasis. *Cancer Res.* 2009 Jul 1; 69(13):5546-52.

Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29:235-71.

Vroon A, Heijnen CB, Kravellaars. GRKs and arrestins: regulators of migration and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology.* 2006 Dec; 80:1214-21.

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.

White JM. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol.* 2003 Oct; 15(5):598-606.

Wolfsberg TG, Primakoff P, Myles DG, White JM. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J Cell Biol.* 1995 Oct; 131(2):275-8.

Woo CH, You HJ, Cho SH, Eom YW, Chun JS, Yoo YJ, *et al.* Leukotriene B(4) stimulates Rac-ERK cascade to generate reactive oxygen species that mediates chemotaxis. *J Biol Chem.* 2002 Mar; 277(10):8572-8.

Wu Y, Wang S, Farooq SM, Castelveter MP, Hou Y, Gao JL, *et al.* A chemokine receptor CXCR2 macromolecular complex regulates neutrophil functions in inflammatory diseases. *J Biol Chem.* 2012 Feb 17; 287(8):5744-55.

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.

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.

Yan Y, Shirakabe K, Werb Z. The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. *J Cell Biol.* 2002 Jul 22; 158(2):221-6.

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.

Zheng Y, Cai Z, Wang S, Zhang X, Qian J, Hong S, *et al.* Macrophages are an abundant component of myeloma microenvironment and protect myeloma cells from chemotherapy drug-induced apoptosis. *Blood.* 2009 Oct 22; 114(17):3625-8.

Zhu L, He P. fMLP-stimulated release of reactive oxygen species from adherent leukocytes increases microvessel permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 Jan; 290(1):365-72.

Zigrino P, Mauch C, Fox JW, Nischt R. Adam-9 expression and regulation in human skin melanoma and melanoma cell lines. *Int J Cancer.* 2005 Oct 10; 116(6):853-9.

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.

Zigrino P, Steiger J, Fox JW, Löffek S, Schild A, Nischt R, *et al.* Role of ADAM-9 disintegrin-cysteine-rich domains in human keratinocyte migration. *J Biol Chem.* 2007 Oct 19; 282(42):30785-93.