

AÇÃO DE PEPTÍDEO CÍCLICO ANTAGONISTA DE  $\alpha 6\beta 1$  NA  
MODULAÇÃO NEGATIVA DA ADESÃO, MIGRAÇÃO E  
PROLIFERAÇÃO DE MACRÓFAGOS DA LINHAGEM J774A1 EM  
LAMININA

**FRANCIELLE BONET FERRAZ**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

NOVEMBRO 2015

AÇÃO DE PEPTÍDEO CÍCLICO ANTAGONISTA DE  $\alpha_6\beta_1$  NA  
MODULAÇÃO NEGATIVA DA ADESÃO, MIGRAÇÃO E  
PROLIFERAÇÃO DE MACRÓFAGOS DA LINHAGEM J774A1 EM  
LAMININA

**FRANCIELLE BONET FERRAZ**

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Jorge Hernandez Fernandez

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ

NOVEMBRO 2015

**Aos meus pais, Adilson e Odilce,  
de todo meu coração.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Jorge Hernandez Fernandez que abriu as portas do laboratório e me deu a oportunidade de cursar essa etapa sob sua supervisão. Professor, obrigada por sempre participar na decisão das etapas de trabalho e dividir conosco como é possível fazer ciência.

Aos demais professores Arthur Giraldi Guimarães, Renato da Matta, André Carvalho e Gustavo Rezende pelo suporte em diversas etapas de trabalho, desde a cultura celular até a análise dos dados de qPCR.

Certamente não posso esquecer de agradecer as técnicas do LBCT por me dar suporte nas etapas de cultivo e experimentação celular.

À Paula Macêdo Cunha por me conceder a experiência de ser orientadora. Muito além disso, amizade e um grande suporte na realização dos experimentos. Obrigada por construir essa etapa comigo, tratando minhas culturas de células e meus dados como se fossem seus.

Ao grande amigo João de Almeida Filho, ou simplesmente John, que dividiu por tanto tempo a mesma sala, a mesma mesa e até os ouvidos escutando minhas reclamações por horas seguidas. Sucesso para você amigo.

Aos colegas de laboratório Heitor e Carlos Eduardo que forneceram tantos momentos de descontração ao grupo.

Meu imenso agradecimento ao Teófilo que sempre me incentivou em cada etapa e além disso, foi capaz de suportar cada lampejo de ódio em alegria que cada uma me fornecia.

Não poderia deixar de agradecer meus pais que sempre me apoiaram. Obrigada por tanta dedicação pai e mãe. Dedico cada momento a vocês. E, por isso, agradeço a Deus por me amparar até aqui com pessoas maravilhosas como vocês no meu caminho.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Moléculas de adesão celular .....</b>	<b>17</b>
1.1.1 A superfamília das imunoglobulinas .....	17
1.1.2 As selectinas .....	18
1.1.3 As caderinas .....	19
1.1.4 As Integrinas .....	19
<b>1.2 A estrutura das integrinas .....</b>	<b>21</b>
1.2.1 A subunidade $\alpha$ .....	22
1.2.2 A subunidade $\beta$ .....	24
<b>1.3 A nomenclatura das integrinas .....</b>	<b>25</b>
<b>1.4 Interação ligante x integrina .....</b>	<b>27</b>
1.4.1 A laminina como matriz extracelular .....	28
<b>1.5 Adesão e movimentação celular promovidas pela sinalização por integrinas</b>	<b>29</b>
<b>1.6 Eventos associados a sinalização por integrinas .....</b>	<b>32</b>
<b>1.7 Participação das integrinas no sistema imune.....</b>	<b>34</b>
<b>1.8 Participação das integrinas no câncer e metástases.....</b>	<b>35</b>
<b>1.9 As desintegrinas bloqueiam a capacidade de interação das integrinas .....</b>	<b>36</b>
1.9.1 Proteínas ADAMs interagem com integrinas de forma específica .....	37
<b>1.10 Peptídeos que interagem com integrinas atuam como modelos terapêuticos .....</b>	<b>39</b>
1.10.1 O peptídeo A9(x).....	41
<b>1.11 O papel dos macrófagos no estudo das integrinas .....</b>	<b>42</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>44</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1 Objetivo geral .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>46</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1 Biologia Celular .....</b>	<b>47</b>
4.1.1 Cultura e manutenção de macrófagos.....	47
4.1.2 Peptídeo cíclico.....	47
4.1.3 Teste de adesão celular.....	48
4.1.4 Demonstração de concentrações inibitórias 50% (IC <sub>50</sub> ).....	49
4.1.5 Ensaio de MTT.....	49

4.1.6 Ensaio de migração <i>in vitro</i> – <i>Transwell</i> .....	49
4.1.7 Ensaio de cicatrização .....	50
4.1.8 Análises estatísticas .....	50
<b>4.2 Biologia Molecular .....</b>	<b>50</b>
4.2.1 Extração de RNA e síntese de cDNA .....	50
4.2.2 Desenho de <i>primers</i> específicos.....	51
4.2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) <i>Hot Start</i> e <i>Touchdown</i> .....	51
4.2.4 Seleção e validação de genes de referência para qPCR.....	53
4.2.5 Realização de qPCR utilizando <i>Integrin signaling array</i> .....	54
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
<b>5.1 Resultados obtidos em Biologia Celular .....</b>	<b>57</b>
5.1.1 Diminuição da adesão celular em laminina com preservação da viabilidade celular.....	57
5.1.2 A9a diminui a migração celular <i>in vitro</i> - <i>transwell</i> - em laminina.....	59
5.1.3 Modulação negativa da adesão, migração e proliferação celular .....	60
<b>5.2 Resultados obtidos em Biologia Molecular .....</b>	<b>63</b>
5.2.1 Qualidade e integridade das amostras de cDNA.....	63
5.2.2 Análise dos produtos do PCR <i>Hot Start/Touchdown</i> .....	63
5.2.3 Especificidade da amplificação dos produtos por qPCR.....	64
5.2.4 Padrão de expressão dos genes de referência nas células J774A1 em laminina .....	67
5.2.5 Análise da estabilidade de expressão dos genes de referência em macrófagos quando associados à ECM .....	68
5.2.6 Expressão das subunidades de integrinas e o efeito do peptídeo A9a sobre a expressão das integrinas.....	71
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>6.1 O peptídeo cíclico A9a como modulador negativo de macrófagos em laminina.....</b>	<b>74</b>
<b>6.2 Confirmação da presença de <math>\alpha 6\beta 1</math> em macrófagos da linhagem J774A1....</b>	<b>76</b>
<b>6.3 Escolha dos genes <i>RPL13A</i>, <i>PPIA</i>, <i>GAPDH</i> e <i>GUSB</i> como genes de referência para estudos de macrófagos relacionados à ECM.....</b>	<b>76</b>
<b>6.4 O peptídeo cíclico A9a não altera a expressão de seu ligante específico ...</b>	<b>79</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>81</b>
<b>8 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>83</b>
<b>9 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>84</b>

## RESUMO

Integrinas são fatores moleculares ubíquos que participam da adesão, migração e proliferação celular. A integrina  $\alpha6\beta1$  é o principal receptor para família das lamininas e essa interação laminina- $\alpha6\beta1$  exerce um importante papel no câncer e em processos metastáticos. As integrinas são expressas em todos os tipos de células, porém de modo notório nas células do sistema imune como macrófagos. Os macrófagos estão associados a tumores e conseqüentemente envolvidos na regulação do microambiente tumoral, progressão tumoral e metástase. Com intuito de modular negativamente a adesão e migração de macrófagos da linhagem J774A1 em laminina, foi desenvolvido *in silico* um peptídeo cíclico (A9a) baseado no *loop* interativo presente no domínio *desintegrin-like* da ADAM9 para interagir com a integrina  $\alpha6\beta1$ . *In vitro*, pequenas concentrações de A9a (0,1nM) demonstraram reduzir a adesão celular em poços incubados com laminina (10 $\mu$ g/mL), sendo capaz de modular negativamente a adesão celular de modo estatisticamente significativo em até ~80% com 7,5nM. IC<sub>50</sub> foi obtido com 0,2-0,25nM de A9a. Em experimentos de invasão celular em membranas do tipo *transwell* incubadas com laminina (10 $\mu$ g/mL), o peptídeo cíclico A9a reduziu significativamente a migração dos macrófagos de modo dose-dependente (1nM - 25%, 10nM - 37,5% e 100nM - 62,5%). De acordo com os resultados dos testes de adesão e invasão, o ensaio de cicatrização também demonstrou que A9a, em concentrações nM, modula negativamente a adesão, migração e proliferação celular nas primeiras 30 horas de experimento. E, ao decorrer dos experimentos, as células permaneceram viáveis sugerindo baixa toxicidade do antagonista A9a, como mostrado pelo MTT. Experimentos de quantitativos de PCR real-time demonstraram que A9a não afetou a expressão das subunidades de integrina  $\alpha6$  e  $\beta1$ . No entanto, A9a aumentou a expressão da subunidade de integrina  $\alpha5$ , a qual não é o alvo original do peptídeo desenhado. Nesse estudo, especula-se que a interação mecânica de A9a com  $\alpha6\beta1$  possa interferir diretamente na interação integrina-ligante (laminina) e que o aumento de expressão da subunidade  $\alpha5$  possa estar envolvido com vias de sinalização. Esse conjunto de dados sugere um papel importante para o peptídeo cíclico A9a como antagonista de integrina e, futuras pesquisas podem revelar o potencial deste inibidor como uma ferramenta terapêutica em processos inflamatórios e metastáticos.

**Palavras-chave:** Integrinas, Adesão, Migração, Macrófagos, Peptídeo cíclico.

## ABSTRACT

Integrins are ubiquitous molecular factors that participate in cell adhesion, proliferation and migration processes. The  $\alpha6\beta1$  integrin is the major receptor of the laminin family and plays a notorious role in immune and metastasis processes. Integrins are expressed on all cell types, but well-known manner in immune cells such as macrophages. Among other important physiological functions, macrophages are involved in immune responses and tumor-associated macrophages are also involved in regulation of tumor microenvironment, progression and metastasis. In order to downregulate J774A1 macrophages adhesion, migration and proliferation to laminin was designed *in silico* a cyclic peptide (A9a) based on disintegrin-like interactive loop domain present on ADAM9 to interact with  $\alpha6\beta1$ . *In vitro*, lower concentration of A9a (0.1nM) reduce cell adhesion to laminin (10 $\mu$ g/mL) coated wells. Being able to downmodulate ~80% of cell adhesion in a statistically significant manner by 7,5nM. IC<sub>50</sub> was achieved at 0.2-0.25nM of A9a. In invasion experiments to laminin coated transwell plates (10 $\mu$ g/mL), A9a cyclic peptide significantly reduced migrating macrophages in dose-dependent manner (1nM - 25%, 10nM - 37.5% and 100nM - 62.5%). Accordingly, in wound healing assay data shows that A9a inhibitor, in nM concentrations downregulate cell adhesion, migration and proliferation in the first 30 hours of experiments. It should be noted that the cells remained viable at the end of the experiments, suggesting low toxicity of the antagonist A9a, as observed at MTT. In real-time quantitative experiments data shows that A9a inhibitor did not affect  $\alpha6$  and  $\beta1$  integrin subunits expression in macrophages although increased the expression of  $\alpha5$  integrin. Herein, we speculate that the mechanic interaction of A9a to  $\alpha6\beta1$  may interfere directly to integrin-ligand (laminin) and the increase in  $\alpha5$  subunit expression may be involved with signaling pathways. Our data suggest a role for A9a as peptide integrin antagonist and future research may reveal a potential use for it as a therapeutic tool for inflammatory processes or cancer metastasis.

**Key words:** Integrin, Adhesion, Migration, Macrophages, Cyclic peptide.



**ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>3'</b>	Regiões à montante do DNA
<b>5'</b>	Regiões à jusante do DNA
<b>ADAM</b>	<i>A disintegrin and metalloprotease</i>
<b>ADAMTS</b>	<i>A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs</i>
<b>ADMIDAS</b>	<i>Adjacent metal ion-dependent adhesion site</i>
<b>AMPc</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>BLAST</b>	<i>Basic local alignment search tool</i>
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Cálcio
<b>CAM</b>	<i>Cell adhesion molecule</i>
<b>CD3</b>	<i>Cluster of differentiation 3</i>
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementar
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>ECD</b>	Glu-Cys-Asp
<b>ECM</b>	Matriz extracelular
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EGF</b>	<i>Epidermal growth factor</i>
<b>ERK</b>	<i>Extracellular regulated kinase</i>
<b>FAK</b>	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
<b>Fas-L</b>	Ligante de Faz
<b>GFFKR</b>	Gly-Phe-Phe-Lys-Arg
<b>GFFXR</b>	Gly-Phe-Phe-AA-Arg

<b>GPIIa</b>	<i>Platelet glycoprotein Ia/Ia</i>
<b>GPIcIIa</b>	<i>Platelet glycoprotein Ic/Ia</i>
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>HGF</b>	<i>Hepatocyte growth factor</i>
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração necessária para ocasionar 50% da inibição da adesão celular
<b>ICAM</b>	<i>Intracellular cell adhesion molecule</i>
<b>ICAM-1</b>	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>L1</b>	<i>Neuronal cell adhesion molecule, member of the L1 protein family</i>
<b>LFA</b>	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
<b>LIMBS</b>	<i>Ligand-induced metal binding</i>
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen activated proteins kinase</i>
<b>MgCl</b>	Cloreto de magnésio
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b>mTOR</b>	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
<b>NCAM</b>	Neural cell adhesion molecule
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear kappa B
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino
<b>PCK</b>	<i>Protein kinase-C</i>
<b>PCR</b>	Reação da polimerase em cadeia
<b>PDGF</b>	<i>Platelet-derived growth factor</i>
<b>PHSRN</b>	Pro-His-Ser-Arg-Asn
<b>PKA</b>	<i>Protein kinase A</i>
<b>PLA2</b>	Fosfolipase A2

<b>PLC</b>	Fosfolipase C
<b>PSI</b>	<i>Plexina-semaforina-integrina</i>
<b>qPCR</b>	Reação da polimerase em cadeia quantitativo
<b>RAP</b>	<i>GTP-binding protein</i>
<b>RAS</b>	<i>GTPase</i>
<b>RGD</b>	Arg-Gly-Asp
<b>RGDFV</b>	Arg-Gly-Asp-Phe- Val
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SLAYGLR</b>	Ser-Leu-Ala-Tyr-Gly-Leu-Arg
<b>SVMP</b>	<i>Snake venom metalloproteinase</i>
<b>TCR</b>	Receptores de células T
<b>TGF<math>\beta</math></b>	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
<b>VCAM</b>	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
<b>VCAM-1</b>	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
<b>VLA</b>	<i>Very late after activation</i>
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	Zinco
<b><math>\Delta\Delta Ct</math></b>	<i>Comparative cycle threshold</i>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Heterodímeros formados pela interação de diferentes subunidades $\alpha$ e $\beta$ de integrinas. Adaptado de Hynes (2002). .....	20
<b>Figura 2:</b> Esquema da integrina $\alpha$ IIb $\beta$ 3. A subunidade $\alpha$ IIb está representada em vermelho enquanto a subunidade $\beta$ 3 está representada em azul. A- Estrutura inativa. B- Estrutura ativa da integrina, em sua forma estendida. Na subunidade $\alpha$ contém em seu domínio extracelular a região de união a cátions bivalentes. O domínio citoplasmático é responsável pela fixação do dímero ao citoplasma. Adaptado de Shattil <i>et al.</i> (2010). .....	22
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática da estrutura das subunidades de integrina $\alpha$ e $\beta$ . Adaptado de Marín (2002). .....	23
<b>Figura 4:</b> Esquema representativo de integrina contendo o domínio $\alpha$ I na subunidade $\alpha$ . A- Representação dos domínios da subunidade $\alpha$ . B- Representação da organização dos domínios em integrinas que possuem a subunidade $\alpha$ com o domínio $\alpha$ I. Estrelas representam os sítios de ligação de cátions bivalentes. Adaptado de Barczyk <i>et al.</i> (2010). .....	24
<b>Figura 5:</b> Sinalização por integrinas e a inter-relação com demais vias de sinalização (Tan, 2012). .....	31
<b>Figura 6:</b> Estrutura de domínio de ADAMs e SVMPs. Adaptado de Black e White (1998). .....	37
<b>Figura 7:</b> Demonstração do peptídeo cíclico A9a. Adaptado de Fernandez <i>et al.</i> (2007). .....	48
<b>Figura 8:</b> Porcentagem de adesão celular obtida a partir de testes de adesão celular com culturas de macrófagos da linhagem J774A1 em poços incubados com laminina e diferentes concentrações adicionadas do peptídeo cíclico A9a. As barras representam o desvio padrão e asteriscos (*) mostram a significância estatística (* $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,001$ ; $n = 6$ ). .....	58

- Figura 9:** Gráfico com demonstração do *slope* para visualização dos valores sugeridos para IC<sub>50</sub> a partir de regressão não linear obtida pelo *GraphPad Prism5*. O valor de IC<sub>50</sub> para A9a pode ser observado entre 0,2nM e 2,5nM. As barras representam o desvio padrão e asteriscos (\*) mostram a significância estatística (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; n=6). .....58
- Figura 10:** Resultado de ensaio de MTT realizado de acordo com Mosmann (1983) ajustado para 48hs. Em todas as concentrações de A9a utilizadas foi observada viabilidade celular pela formação de cristais de formazan e ausência de diferenças estatísticas quando os valores foram comparados ao controle. As barras representam o desvio padrão (n=6).....59
- Figura 11:** Número de células que migraram através das membranas incubadas com laminina frente a diferentes concentrações de peptídeo cíclico A9a. As barras representam o desvio padrão e asteriscos (\*) mostram a significância estatística (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; n=3).....60
- Figura 12:** A - Imagens obtidas a partir dos diferentes tempos de análise do teste de cicatrização (0, 6, 24, 30 e 48h). I – Ensaio de cicatrização realizado em poços incubados com laminina sem a adição de qualquer peptídeo cíclico. II - Ensaio de cicatrização realizado em poços incubados com laminina que receberam adição de 1nM de peptídeo cíclico A9a. III - Ensaio de cicatrização realizado em poços incubados com laminina que receberam adição de 100nM de peptídeo cíclico A9a. B - Análise do fechamento das lesões realizadas nas culturas celulares dispostas para adesão em laminina, durante o ensaio de cicatrização celular nos intervalos de tempo 0, 6, 24, 30 e 48h, frente a diferentes concentrações de peptídeo cíclico. O asterisco (\*) mostra a significância estatística (\*p<0,05, n=6). .....61
- Figura 13:** Imagens obtidas para demonstrar a ausência de alterações morfológicas aparentes nas células J774A1 de poços incubados com laminina sem a adição de peptídeo cíclico A9a (Ctrl), de poços incubados com laminina que receberam adição de 100nM de peptídeo cíclico A9a por 24h (24h + A9a) e, de poços incubados com laminina que receberam adição de 100nM de peptídeo cíclico A9a por 48h (48h + A9a) (n=6). .....62

**Figura 14:** Comparação semi quantitativa dos produtos do PCR *Hot Start/Touchdown*, apresentando as proporções de expressão das subunidades de integrina  $\beta 1$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 5$  e  $\alpha 11b$  quando comparado a expressão da subunidade  $\beta 3$ .....64

**Figura 15:** *Melting curves* obtidas pelo programa *StepOne v2.1 (Applied Biosystems)* de 8 genes de referência candidatos, demonstrando um único pico de amplificação. Cada experimento foi realizado com  $n=9$ . A - *Melting curve* de qPCR realizado com cDNA obtido de culturas de células sob condições normais (Ctrl). B - *Melting curve* de qPCR realizado com cDNA obtido de células cultivadas sobre laminina por 6hs (6h+lam). C - *Melting curve* de qPCR realizado com cDNA obtido de células cultivadas sobre laminina por 24hs (24h+lam) .....66

**Figura 16:** Produtos da eletroforese em gel de agarose 2% visualizados em luz UV, com tamanho esperado para cada gene estudado nesta etapa. A - *Melting curve* de qPCR realizado com cDNA obtido de culturas de células sob condições normais. B - *Melting curve* de qPCR realizado com cDNA obtido de células cultivadas sobre laminina por 6hs. C - *Melting curve* de qPCR realizado com cDNA obtido de células cultivadas sobre laminina por 24hs. Números representam 1= *ACTB*, 2= *B2M*, 3= *GAPDH*, 4= *GUSB*, 5= *HTPR1*, 6= *PGK1*, 7= *PPIA*, 8= *RPL13A*. .....67

**Figura 17:** Análise comparativa dos valores de  $\Delta\Delta C_t$  obtidos para os genes de referência candidatos em diferentes condições experimentais. Os valores representam média $\pm$ desvio padrão de 3 repetições, cada um com 3 replicatas ( $n=9$ ). A quantificação relativa foi estimada pela equação  $RQ=2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Ctrl representa os resultados obtidos no qPCR utilizando cDNA na condição controle, ou seja, sob condições normais de cultura. 6h+lam representa os resultados obtidos no qPCR utilizando cDNA de células cultivadas sobre laminina por 6hs. 24h+lam representa os resultados obtidos no qPCR utilizando cDNA de células cultivadas sobre laminina por 24hs. As barras representam o desvio padrão e asteriscos (\*) mostram a significância estatística ( $*p<0,05$ ;  $n=9$ ). ....68

**Figura 18:** Estabilidade de expressão dos genes de referência candidatos classificados por *NormFinder* nas condições experimentais Ctrl (resultados obtidos no qPCR utilizando cDNA na condição controle, ou seja, sob condições normais de cultura), 6h+lam (resultados obtidos no qPCR utilizando cDNA de células cultivadas sobre laminina por 6hs) e 24h+lam (resultados obtidos no qPCR utilizando cDNA de células cultivadas sobre laminina por 24hs). .....70

**Figura 19:** Estabilidade de expressão dos genes de referência candidatos classificados por *geNorm* nas condições experimentais Ctrl (resultados obtidos no qPCR utilizando cDNA na condição controle, ou seja, sob condições normais de cultura), 6h+lam (resultados obtidos no qPCR utilizando cDNA de células cultivadas sobre laminina por 6hs) e 24h+lam (resultados obtidos no qPCR utilizando cDNA de células cultivadas sobre laminina por 24hs). .....71

**Figura 20:** *Plot* de amplificação apresentado pelo programa *StepOne v2.1* demonstrando a expressão das subunidades de integrinas presentes na linhagem celular J774A1 de macrófagos em condições normais de cultura (Ctrl). Cores correspondentes: *ITGA4*=A, *ITGA5*=B, *ITGA6*=C, *ITGAV*=D, *ITGB1*=E, *ITGB3*=F.....72

**Figura 21:** Expressão dos genes das subunidades de integrinas em macrófagos da linhagem J774A1 sob condições normais de cultura (Ctrl), cultivados sobre laminina por 6hs (6h+lam), cultivados sobre laminina por 24hs (24h+lam), cultivados sobre laminina e tratados com 100nM A9a por 6hs (6h+lam+a9a) e cultivados sobre laminina e tratados com 100nM A9a por 24hs (24h+lam+A9a). Os valores representam média±desvio padrão de 3 repetições, cada um com 3 replicatas (n=9). A quantificação relativa foi estimada pela equação  $RQ=2^{-\Delta\Delta CT}$ . As barras representam o desvio padrão e asteriscos (\*) mostram a significância estatística (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001; n=9). .....73

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Diferentes nomenclaturas das integrinas. Adaptado de Barkzyc <i>et al.</i> (2010) e <a href="http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials/Integrins/Integrin.php">http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials/Integrins/Integrin.php</a> .....	26
<b>Tabela 2:</b> Ligantes de integrinas (Petruzelli <i>et al.</i> , 1999; Barkzyc <i>et al.</i> , 2010). .....	28
<b>Tabela 3:</b> <i>Primers</i> desenhados para amplificação das subunidades de integrinas $\alpha 6$ , $\alpha 11b$ , $\alpha 5$ , $\beta 1$ e $\beta 3$ . .....	52
<b>Tabela 4:</b> Condições de amplificação aplicadas para o PCR do tipo <i>Hot Start</i> e <i>Touchdown</i> . .....	52
<b>Tabela 5:</b> Genes de referência candidatos no presente estudo. ....	54
<b>Tabela 6:</b> Condições de amplificação do qPCR de acordo com o protocolo do fabricante. ....	56
<b>Tabela 7:</b> Genes selecionados do kit <i>Integrin Signaling Array</i> para o estudo utilizando qPCR. ....	56
<b>Tabela 8:</b> Dados obtidos a partir da análise densitométrica utilizando o programa <i>GelAnalyzer</i> . ....	64
<b>Tabela 9:</b> Estatística descritiva dos genes de referência candidatos baseado no valor de <i>crossing point</i> (CP) obtida pelo programa <i>BestKeeper</i> n = número de experimentos; nt = número de réplicas técnicas e suas replicatas; GM = média geométrica; AM = média aritmética; Min = valor mínimo; Max = valor máximo; SD = desvio padrão; r = coeficiente de correlação de Pearson; CV = coeficiente de variância (%) entre as amostras (Ctrl; 6h+lam; 24h+lam); p = valor de p. ....	69



## ÍNDICE DE EQUAÇÕES

**Equação 1:** Equação utilizada para converter os valores obtidos de  $\Delta\Delta Ct$  em quantidades relativas (*Relative quantification* = RQ) a fim de elevar a eficiência da reação e facilitar a observação dos dados quando comparadas ao gene de referência (RQ=1). O desvio padrão é estabelecido pelo erro padrão do  $\Delta Ct$ , em intervalo de confiança de 95%. Adaptado de *User Bulletin #2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System*; Livak e Schmittgen (2001). .....55

**Equação 2:** Expressão final das diversas fórmulas aritméticas utilizadas para medir a quantidade do gene alvo em relação a um gene normalizador de acordo com a amplificação exponencial promovida pelo qPCR até atingir um limiar fixo, considerando mesma a eficiência do alvo e do normalizador.  $X_{N,q}$ = quantidade normalizada média do gene alvo na amostra;  $X_{N,cb}$ = quantidade normalizada média do gene referência; K=constante; E= eficiência na amplificação do gene alvo e do gene referência;  $\Delta Ct_{,q}$ = diferença nos ciclos limiares na amplificação do gene alvo;  $\Delta Ct_{,cb}$ = diferença nos ciclos limiares para o gene referência;  $\Delta\Delta Ct$ = a quantidade de alvo normalizados para uma referência endógena e em relação a um padrão. Adaptado de *User Bulletin #2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System*. .....55

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Moléculas de adesão celular

O funcionamento dos organismos multicelulares depende da interação entre diversos elementos, incluindo células e matriz extracelular (ECM) por meio da adesão e a comunicação entre eles (Hynes; Zhao, 2000). Contudo, a resposta específica da célula à ECM depende de diversos fatores como o tipo de célula envolvido, o seu estado fisiológico e composição da matriz no momento da interação (Horwitz, 1997). Assim, algumas células respondem a essa interação mudando sua conformação, migrando, proliferando, diferenciando ou mudando suas atividades.

Assim, para ocorrer a interação entre células-célula e célula-matriz é necessária a participação de diversos receptores de adesão celular. Essas moléculas de adesão celular (CAM) estão divididas em quatro importantes famílias, sendo a superfamília das imunoglobulinas, as selectinas, as caderinas e as integrinas (Alberts *et al.*, 2010). Existem outras famílias de receptores de adesão que são menos compreendidos como sindecanos e proteoglicanos ligados à membrana, e ainda, a família das desintegrinas (Hynes, 1999).

As CAM se localizam na superfície das células e podem realizar ligações homotípicas, ou seja, entre moléculas semelhantes como algumas caderinas e imunoglobulinas. Ainda, imunoglobulinas, integrinas e selectinas podem realizar ligações heterotípicas, que ocorre entre diferentes tipos de moléculas de adesão (Kumar *et al.*, 2005; Alberts *et al.*, 2010).

As integrinas possuem uma especificidade maior ao ligante e são responsáveis por muitos eventos envolvendo a adesão celular. A adesão promovida pela interação entre célula-matriz é geralmente realizada por membros da família das integrinas. E, as ligações realizadas particularmente por integrinas fornecem um mecanismo de força mecânica e ativação das vias de transdução de sinais intracelulares que respondem a essas forças (Kumar *et al.*, 2005).

#### 1.1.1 A superfamília das imunoglobulinas

A superfamília das imunoglobulinas foi a primeira família de moléculas de adesão descoberta (Williams; Barclay, 1998), sendo a segunda maior classe de moléculas de adesão (Walsh; Doherty, 1997). Essa família é caracterizada por glicoproteínas de membrana plasmática conhecidas como imunoglobulinas (Ig) cuja estrutura molecular típica compreende um domínio extracelular grande, um único

segmento helicoidal transmembranar e um domínio citoplasmático (Aplin *et al.*, 1998). Cada um desses domínios é composto por 70 a 110 aminoácidos organizados em uma estrutura compactada (Karp, 2010).

Grande parte dos membros da superfamília das imunoglobulinas medeiam a adesão célula-célula independente de cálcio e também estão envolvidas em vários aspectos do sistema imunológico como por exemplo, interações específicas com linfócitos e macrófagos para uma resposta imune. Entretanto, alguns membros da superfamília das imunoglobulinas, como VCAM (*vascular cell adhesion molecule*), NCAM (*neural cell adhesion molecule*) e L1 (*Neuronal cell adhesion molecule, member of the L1 protein family*), medeiam a adesão entre as células não imunes (Karp, 2010).

### 1.1.2 As selectinas

Outro grupo das CAM bem estudado são as selectinas. As selectinas são uma família de glicoproteínas de membrana celular que reconhecem e se ligam a um arranjo particular de açúcares nos oligossacarídeos que se projetam a partir das superfícies de outras células. Tal ligação heterotípica das selectinas aos seus ligantes carboidratos requer cálcio (Karp, 2010).

As selectinas são constituídas por um pequeno domínio citoplasmático, um único domínio transmembranar e um segmento extracelular grande que consiste de um número de módulos separados, incluindo um domínio externo que funciona como a lectina.

Essa família é responsável por promover interações transientes entre leucócitos em circulação e as paredes dos vasos nos locais de inflamação e coagulação. Essas interações são desafiadoras considerando a velocidade em que essas células estão fluindo através da corrente sanguínea. Contudo, as ligações entre selectinas e seus ligantes é extremamente eficiente uma vez que a interação se torna mais forte quando há tensão mecânica, como ocorre quando o leucócito está atravessando o endotélio (Karp, 2010).

Até o momento são conhecidas a E-selectina, presentes nas células endoteliais; a P-selectina, presente em plaquetas e células endoteliais; e a L-selectina, presente nos leucócitos (Bevilacqua *et al.*, 1993). Sendo que, cada uma das selectinas é responsável por reconhecer um agrupamento específico de açúcares presente nas extremidades das cadeias de carboidratos complexos de certas glicoproteínas.

### 1.1.3 As caderinas

As caderinas são uma família de glicoproteínas de superfície celular envolvidas em interações homotípicas dependentes de cálcio que promovem a adesão célula-célula e transmitem sinais da ECM (matriz extracelular) para o citoplasma através de sistemas cálcio dependentes (Takeichi, 1988).

Até o momento são conhecidas as E-caderina (epitelial), as N-caderina (neural), as P-caderina (placenta) e as V-caderina (tecido vascular). Estas caderinas contêm um segmento extracelular relativamente grande, constituído por cinco domínios em tandem, de tamanho e estrutura semelhante, um único segmento transmembranar e um domínio citoplasmático pequeno homólogo a todas caderinas clássicas, que se ligam ao citoesqueleto de actina (Hynes, 1999). O domínio citoplasmático é em geral associado com membros da família de proteínas citosólicas, as cateninas, que agregam as caderinas ao citoesqueleto e transmitem sinais para o citoplasma e núcleo. Esse fato pode ser um fator importante em moldar células em tecidos coesos no embrião, mantendo-os juntos no indivíduo adulto (Karp, 2010).

### 1.1.4 As Integrinas

As integrinas são a mais extensa família das CAM (Hynes, 1992).

O termo integrina foi inicialmente utilizado a fim de referir-se ao papel de intermediador na comunicação entre o citoesqueleto e proteínas plasmáticas ou da ECM por meio da adesão célula-a-célula através de interações com outras proteínas de membrana com função adesiva como ICAM-1, 2 e 3, VCAM-1 e caderina E (Darribere *et al.*, 2000; Clegg *et al.*, 2003; Jin; Varner, 2004; Alberts *et al.*, 2010).

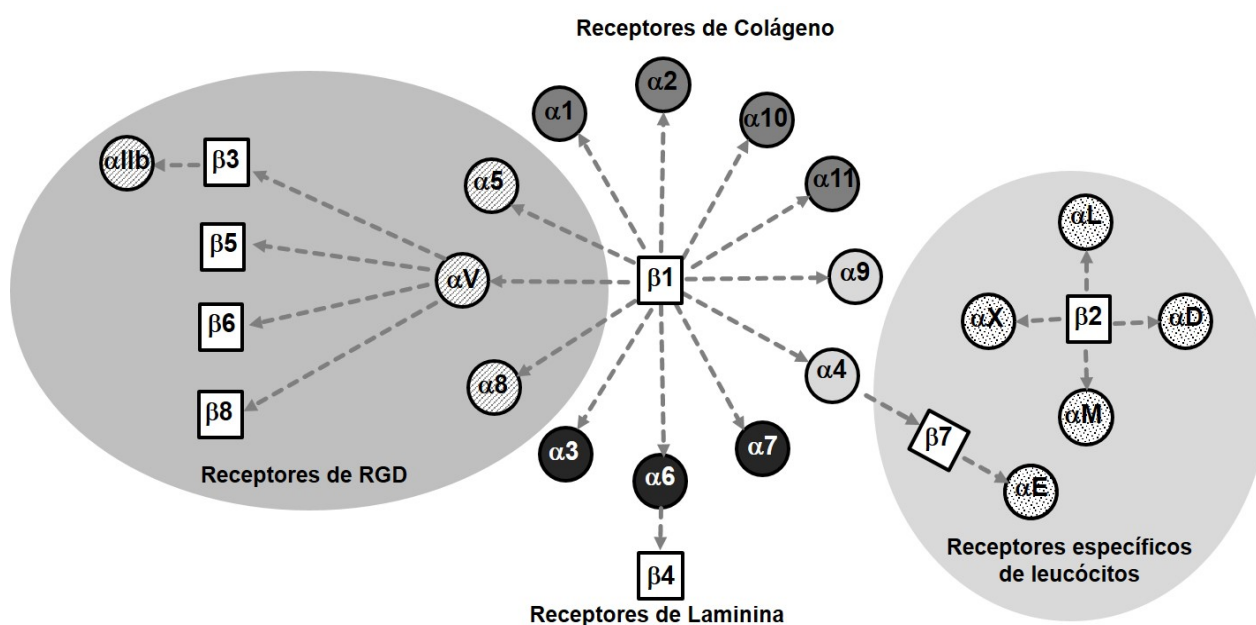
A maioria das integrinas são predominantemente ou exclusivamente os receptores para as proteínas de ECM tais como fibronectinas, lamininas e colágenos. Mas algumas integrinas também desempenham um papel importante na adesão celular heterotípica, mais notavelmente de leucócitos, onde eles se ligam a contra receptores da superfamília das imunoglobulinas ou a uma caderina (Karp, 2010).

As integrinas estão expressas em todos os tipos de células, exceto nos eritrócitos maduros (Hemler, 1990). Sendo assim, nos mamíferos, é possível encontrar cerca de 20 integrinas diferentes (Kreidberg; Symons, 2000). E, em alguns casos, as integrinas são os receptores majoritariamente expressos na superfície de membrana da célula, como as plaquetas, que apresentam aproximadamente 80.000 cópias da integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (Shattil *et al.*, 1998).

As integrinas são proteínas transmembrana heterodiméricas, pertencentes ao grupo das CAM, formadas por uma subunidade  $\alpha$ , de 120 a 180kDa, e uma subunidade  $\beta$ , de 90 a 110kDa, as quais estão ligadas não covalentemente entre si. Existem 18 subunidades  $\alpha$  e 8 subunidades  $\beta$  conhecidas, as quais combinadas formam pelo menos 24 heterodímeros distintos de integrinas (Hynes, 2002) (Figura 1).

Esta associação dos diferentes tipos de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  pode formar proteínas com diferentes especificidades de ligação e, conseqüentemente, com diferentes atividades biológicas (Plow *et al.*, 2000).

As integrinas são expressas de modo ubiqüitário (Yamada, 1997). Durante o desenvolvimento embrionário, especialmente durante a gastrulação, a neurulação e a histogênese há maior expressão de integrinas (Albeda; Buck, 1990). Contudo, a expressão de integrinas diminui à medida que a diferenciação celular chega ao estágio adulto. E assim, a interação das integrinas com a ECM permanece exercendo papéis extremamente importantes na proliferação celular, na diferenciação celular, na apoptose, na expressão gênica e no sistema imunológico como receptores de processos inflamatórios e inflamação em eventos trombóticos (Albeda; Buck, 1990).

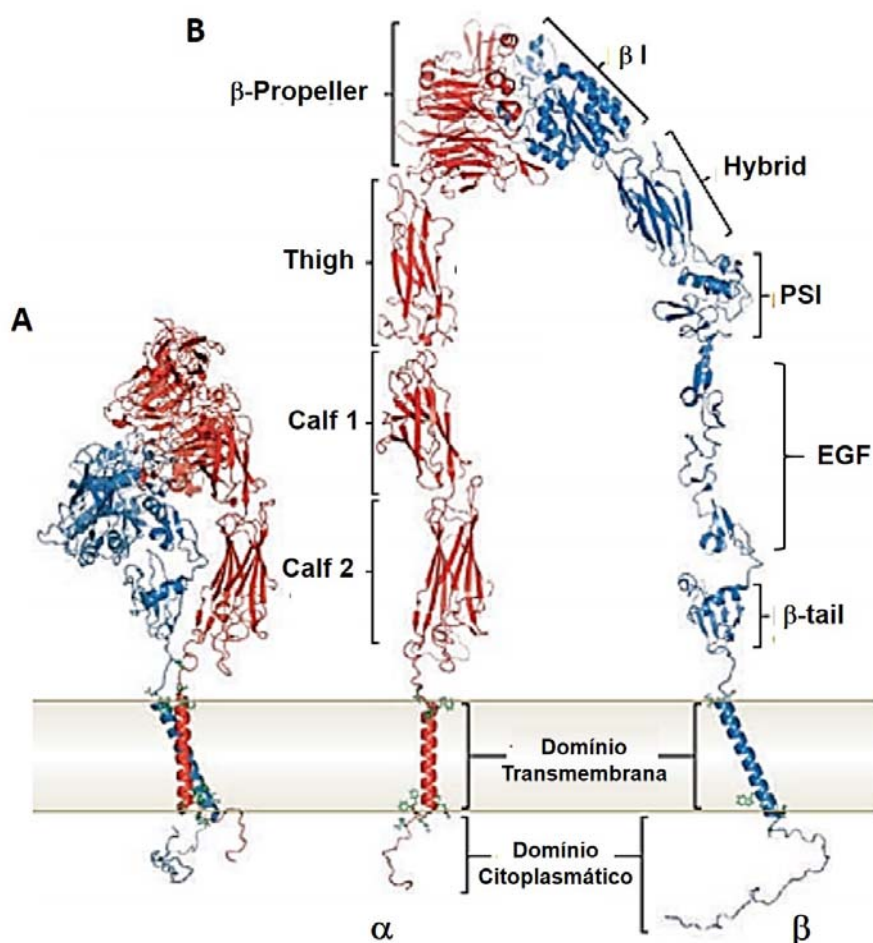


**Figura 1:** Heterodímeros formados pela interação de diferentes subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  de integrinas. Adaptado de Hynes (2002).

## 1.2 A estrutura das integrinas

Cada subunidade de integrina consiste de um domínio extracelular, uma região transmembrana e uma pequena região citoplasmática (cerca de 30 a 40 aminoácidos). Nos domínios N-terminais da cadeia  $\alpha$  e da cadeia  $\beta$ , localizados no domínio extracelular, estão as regiões importantes para a adesão ao ligante. Essas regiões são mais especificamente os domínios  $\beta$ -*propeller* da cadeia  $\alpha$  e  $\beta$ I da cadeia  $\beta$  das integrinas que se unem formando uma estrutura globular conhecida como “cabeça” da integrina, que é responsável pela ligação ao ligante extracelular (Avraamides *et al.*, 2008) (Figura 2).

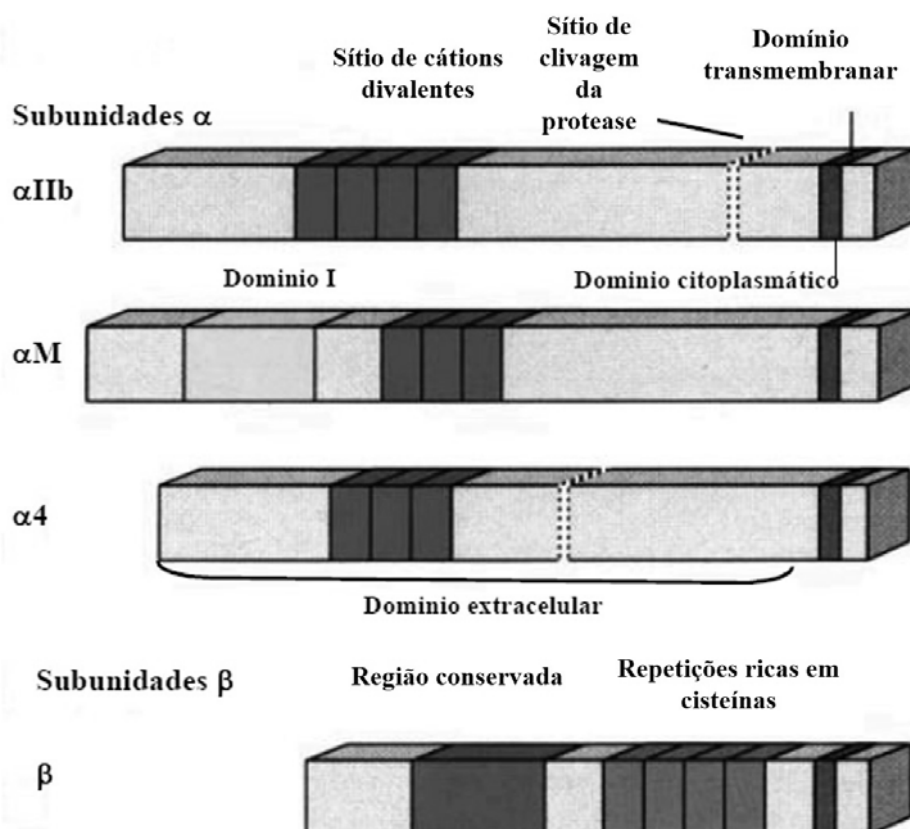
O domínio  $\beta$ -*propeller* da cadeia  $\alpha$  é formado por 60 resíduos arranjados radialmente, contendo 4 folhas  $\beta$  antiparalelas cada, contudo, não apresenta a região metal-ligante. (Figura 2). Já, o domínio  $\beta$ I da cadeia  $\beta$  é formado de 6 folhas  $\beta$  paralelas, rodeadas por 8  $\alpha$ -hélices (Xiong *et al.*, 2002), topologia comum presente em várias enzimas intracelulares (Lee *et al.*, 1995). Na cavidade central deste domínio está a região MIDAS (*metal ion-dependent adhesion site*) que consiste em um local de adesão dependente de um íon metálico, que necessita criticamente de cátions de metais bivalentes para desempenhar um papel importante e fundamental na adesão e reconhecimento dos ligantes à integrina (Xiong *et al.*, 2002). Adjacente ao sítio MIDAS, localizam-se mais dois sítios de ligação metal bivalentes, o ADMIDAS (*adjacent MIDAS*) e o LIMBS (*ligand-induced metal binding site*). Essas três regiões dependentes de cátions bivalentes atuam como efetores, promovendo a adesão a ligantes e como seletores, pela modificação da especificidade de adesão de ligantes à integrina (Plow *et al.*, 2000).



**Figura 2:** Esquema da integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ . A subunidade  $\alpha\text{IIb}$  está representada em vermelho enquanto a subunidade  $\beta\text{3}$  está representada em azul. A- Estrutura inativa. B- Estrutura ativa da integrina, em sua forma estendida. Na subunidade  $\beta$  contém em seu domínio extracelular a região de união a cátions bivalentes. O domínio citoplasmático é responsável pela fixação do dímero ao citoplasma. Adaptado de Shattil *et al.* (2010).

### 1.2.1 A subunidade $\alpha$

As subunidades  $\alpha$  de integrina são homólogas entre si. Esta homologia ocorre tanto nos domínios citoplasmáticos, quanto nos transmembranares e extracelulares (Takada *et al.*, 1989). De acordo com seus domínios extracelulares, as subunidades  $\alpha$  de integrinas podem ser divididas em 3 grandes grupos (Figura 3). Um dos grupos engloba integrinas que possuem quatro sítios de provável união aos cátions bivalentes e um sítio de clivagem de uma protease ( $\alpha\text{IIb}$ ,  $\alpha\text{5}$ ,  $\alpha\text{6}$ ,  $\alpha\text{7}$  e  $\alpha\text{3}$ ). Um grupo representado apenas pela subunidade  $\alpha\text{4}$ , possui três sítios de provável adesão de cátions bivalentes e um sítio de clivagem de uma protease (Diamond *et al.*, 1994). E, por fim, o grupo que engloba integrinas com três sítios de provável adesão de cátions bivalentes e uma sequência adicional de 180 a 200 aminoácidos chamado domínio  $\alpha\text{I}$ . Mas não possuem o sítio de clivagem de protease (subfamília  $\beta\text{1}$ ,  $\beta\text{2}$  e na subunidade  $\alpha\text{E}$ ) (Harris *et al.*, 2000).



**Figura 3:** Representação esquemática da estrutura das subunidades de integrina  $\alpha$  e  $\beta$ . Adaptado de Marín (2002).

Nove das subunidades  $\alpha$  de integrinas presente unicamente em vertebrados (Johnson *et al.*, 2009) contém um domínio  $\alpha$ I, também chamado de domínio A devido a homologia com o domínio de mesmo nome no fator *von Willebrand* (Harris *et al.*, 2000), com aproximadamente 200 aminoácidos, localizado entre os segmentos dois e três do domínio  $\beta$ -propeller (Figura 4). Este domínio é capaz de interagir com o colágeno, sendo assim também chamado de hélice  $\alpha$ C (Emsley *et al.*, 1997).

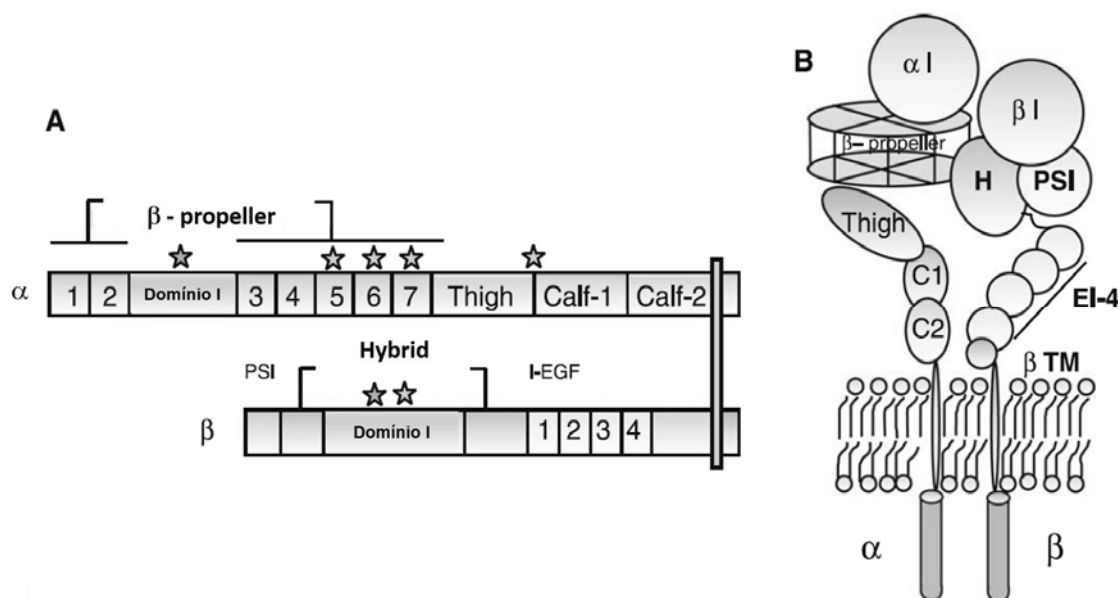
Todas subunidades  $\alpha$  possuem 7 segmentos amino-terminais repetidos na região extracelular que se dobram dentro do domínio  $\beta$ -propeller, o qual está conectado aos domínios *Thigh*, *Calf-1* e *Calf-2* (Figura 2). Os últimos três ou quatro domínios do  $\beta$ -propeller contém domínios EF-hand que se ligam a íons bivalentes na face inferior dos segmentos. A ligação desses íons nesta região faz com que se altere alostericamente a interação aos ligantes (Humphries *et al.*, 2003).

Os domínios citoplasmáticos das subunidades  $\alpha$  são curtos, com cerca de 15 a 77 aminoácidos e estão bem conservados entre as espécies (Diamond *et al.*, 1994). Nas subunidades  $\alpha$  com o domínio  $\alpha$ I, as regiões citoplasmáticas demonstram certa



divergência. No entanto, todas as subunidades  $\alpha$  compartilham pelo menos da sequência GFFKR (Gly-Phe-Phe-Lys-Arg) ou GFFXR (Gly-Phe-Phe-AA-Arg) na região proximal à membrana (Barczyk *et al.*, 2010), região a qual está relacionada a mecanismos de transdução de sinais ou a interação de suas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  (Harris *et al.*; 2000).

A área entre o domínio *Hybrid* na subunidade  $\beta$  e a superfície no domínio  $\beta$ -*propeller* na subunidade  $\alpha$  em geral, também é crucial para a formação do heterodímero intracelularmente, o qual será expresso na superfície da célula (Humphries, 2000). Subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  não existem livres na superfície celular. Em geral, existe grande quantidade de subunidades  $\beta$  na célula e, a quantidade de subunidades  $\alpha$  determinará o número de receptores que será expresso na membrana celular (Santala; Heino, 1991).



**Figura 4:** Esquema representativo de integrina contendo o domínio  $\alpha 1$  na subunidade  $\alpha$ . A- Representação dos domínios da subunidade  $\alpha$ . B- Representação da organização dos domínios em integrinas que possuem a subunidade  $\alpha$  com o domínio  $\alpha 1$ . Estrelas representam os sítios de ligação de cátions bivalentes. Adaptado de Barczyk *et al.* (2010).

### 1.2.2 A subunidade $\beta$

Todas as subunidades  $\beta$  compartilham de uma mesma estrutura básica composta por um grande domínio extracelular com 675 a 700 aminoácidos, um domínio transmembranar hidrofóbico e um pequeno domínio citoplasmático com 40 a 60 aminoácidos. Exceto a subunidade  $\beta 4$  que possui um domínio citoplasmático mais extenso, com cerca de 1000 aminoácidos (Hogervorst *et al.*, 1990).

O domínio extracelular das subunidades  $\beta$  é composto pelos domínios PSI (*plexina-semaforina-integrina*), *Hybrid*,  $\beta 1$  e quatro repetições do domínio EGF

(*epidermal growth factor*) (Lee *et al.*, 1995), as quais auxiliam na manutenção da estrutura da integrina junto com as pontes dissulfeto internas na região C-terminal (Figura 2).

Na região extracelular da cadeia  $\beta$  estão as regiões ligantes a cátions bivalentes como o MIDAS, o ADMIDAS e o LIMBS (Figura 4). O motivo MIDAS é descrito como o sítio de adesão ao ligante dependente de íon metal localizado no domínio  $\beta$ I da cadeia  $\beta$ , o qual diretamente coordena a cadeia lateral de um dos resíduos ácidos em todos os ligantes de integrinas (Plow *et al.*, 2000; Humphries *et al.*, 2003; Craig *et al.*, 2004). O ADMIDAS e o LIMBS também se ligam ao íon bivalente, atuando como efetores, resultando na alteração conformacional ativa da integrina (Plow *et al.*, 2000; Humphries *et al.*, 2003). Em contrapartida, algumas proteínas específicas são essenciais para a ligação e a formação de pontes salinas com a subunidade  $\alpha$ , mantendo a conformação inativa das integrinas (Barczyk *et al.*, 2010).

A comparação entre sequências de subunidades  $\beta$  de diferentes espécies mostrou que estas tratam-se de proteínas altamente conservadas (Lipscomb *et al.*, 1999), mais especificamente tratando-se da região amino-terminal do domínio extracelular, o qual possui afinidade pelo domínio  $\alpha$ I da subunidade  $\alpha$  (Figura 3). E ainda, proteínas têm se mostrado capazes de interagir com a subunidade  $\beta$  das integrinas (Legate; Flassler, 2009).

O domínio intracelular estabelece um encaixe na célula através da interação com proteínas citoplasmáticas como vinculina e talina (Burrige *et al.*, 1988). Conseqüentemente, a subunidade  $\beta$  contém em seu domínio citoplasmático sequências responsáveis por exercer a sinalização celular e associação com o citoesqueleto, como ILK (*integrin linked kinase*) e FAK (*focal adhesion kinase*) (Honda *et al.*, 2009; Michael *et al.*, 2009).

### 1.3 A nomenclatura das integrinas

Devido a associação dos diferentes tipos de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , a nomenclatura das integrinas mais utilizadas baseia-se nessa estrutura básica, seguida de um número. Contudo, alguns nomes cunhados inicialmente ainda permanecem predominantemente na literatura. Por exemplo, a integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, presente principalmente nas plaquetas, é também denominada GPIIb-IIIa. Outras integrinas também expressas nas plaquetas também recebem nomes semelhantes como GPIIa

(*Platelet glycoprotein Ia/IIa*) para a integrina  $\alpha 2\beta 1$  e GPIIb (*Platelet glycoprotein Ic/IIa*) para  $\alpha 5\beta 1$  (Phillips *et al.*, 1988; Kieffer; Phillips, 1990; Phillips *et al.*, 1991).

As integrinas da família  $\beta 2$ , conhecida presente nos leucócitos, também são referidas com o primeiro nome recebido, como por exemplo, LFA-1 para a integrina  $\alpha L\beta 2$ , Mac-1 para  $\alpha M\beta 2$  e p150,95 para  $\alpha X\beta 2$ . A nomenclatura CD (*cluster of differentiation*) também é utilizada, tanto para as subunidades associadas à  $\beta 2$  (CD18) como as associadas à  $\alpha$  (CD11a, b, c) (Hemler, 1990; Springer, 1990).

Cabe salientar que, as integrinas associadas a subunidade  $\beta 1$  também podem ser referidas como antígenos VLA (*very late after activation*) apesar desse nome ter surgido ao mesmo tempo que a descrição de integrinas  $\alpha 1\beta 1$  e  $\alpha 2\beta 1$  em linfócitos (Hemler, 1990).

Entretanto, ao identificar a possibilidade de as células expressarem mais de uma integrina com a mesma subunidade  $\beta$  e que algumas subunidades  $\alpha$  se associam a diferentes subunidades  $\beta$ , a nomenclatura  $\alpha\beta$  é comumente a mais aplicada (Hynes *et al.*, 2002).

**Tabela 1:** Diferentes nomenclaturas das integrinas. Adaptado de Barkzyc *et al.* (2010) e <http://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials/Integrins/Integrin.php>

Nome do gene da integrina	Subunidade	Nome da proteína	Nome CD
<i>ITGA1</i>	$\alpha 1$	INTEGRIN-ALPHA-1; VLA 1a	CD49a
<i>ITGA2</i>	$\alpha 2$	INTEGRIN-ALPHA-2; VLA 2	CD49b
<i>ITGA3</i>	$\alpha 3$	INTEGRIN-ALPHA-3; VLA 3	CD49c
<i>ITGA4</i>	$\alpha 4$	INTEGRIN-ALPHA-4; VLA 4	CD49d
<i>ITGA5</i>	$\alpha 5$	INTEGRIN-ALPHA-5; VLA 5	CD49e
<i>ITGAV</i>	$\alpha V$	INTEGRIN-ALPHA-V	CD51
<i>ITGA6</i>	$\alpha 6$	INTEGRIN-ALPHA-6; VLA 6	CD49f
<i>ITGA7</i>	$\alpha 7$	INTEGRIN-ALPHA-7	
<i>ITGA8</i>	$\alpha 8$	INTEGRIN-ALPHA-8	
<i>ITGA9</i>	$\alpha 9$	INTEGRIN-ALPHA-9	
<i>ITGAD</i>	$\alpha D$	INTEGRIN-ALPHA-D	CD11d
<i>ITGAL</i>	$\alpha L$	INTEGRIN-ALPHA-L	CD11a
<i>ITGAM</i>	$\alpha M$	INTEGRIN-ALPHA-M	CD11b
<i>ITGAX</i>	$\alpha X$	INTEGRIN-ALPHA-X	CD11c
<i>ITGAE</i>	$\alpha E$	INTEGRIN-ALPHA-E	CD103
<i>ITGA2B</i>	$\alpha II\beta$	INTEGRIN-ALPHA-IIB	CD41
<i>ITGAR</i>	$\alpha R$	INTEGRIN-ALPHA-R; GPIIb	
<i>ITGB1</i>	$\beta 1$	INTEGRIN-BETA-1; VLA; GPIIa	CD29
<i>ITGB2</i>	$\beta 2$	INTEGRIN-BETA-2	CD18
<i>ITGB3</i>	$\beta 3$	INTEGRIN-BETA-3; GPIIIa	CD61
<i>ITGB4</i>	$\beta 4$	INTEGRIN-BETA-4	CD104
<i>ITGB5</i>	$\beta 5$	INTEGRIN-BETA-5	
<i>ITGB6</i>	$\beta 6$	INTEGRIN-BETA-6	
<i>ITGB7</i>	$\beta 7$	INTEGRIN-BETA-7; LPALM-1	
<i>ITGB8</i>	$\beta 8$	INTEGRIN-BETA-8	
<i>ITGA1</i>	$\alpha 1$	INTEGRIN-ALPHA-1	CD49a
<i>ITGA2</i>	$\alpha 2$	INTEGRIN-ALPHA-2	CD49b

#### 1.4 Interação ligante x integrina

Interações de ligantes com integrinas envolvem um conjunto complexo de eventos que incluem a ativação, ligação do ligante, reorganização do citoesqueleto, e adesão. Apesar de algumas integrinas interagirem com o ligante sem necessidade do estímulo celular, uma ação meramente mecânica, o recrutamento de leucócitos e de plaquetas requer a participação de diferentes moléculas de adesão, bem como a ativação de vias de sinalização (Shattil *et al.*, 1998).

As interações com os ligantes são realizadas pelo domínio I na subunidade  $\alpha$  (Humphries, 2000). Nas integrinas em que este domínio é inexistente, a adesão é realizada pelo domínio  $\beta$ I, comum a todas integrinas, localizado na interface da subunidade  $\alpha/\beta$  (Xiong *et al.*, 2002). Os cátions bivalentes presentes na região MIDAS, ADMIDAS e LIMBS exercem um papel notório na formação do sítio de ligação (Humphries *et al.*, 2003). Em análise da estrutura cristalográfica da integrina  $\alpha v\beta 3$  na presença e ausência do peptídeo cíclico RGDFV (Arg-Gly-Asp-Phe-Val), foi observado que a adesão à ligantes é dependente diretamente da presença do MIDAS quando interage com o ligante, uma vez que o sítio fica ocupado pelos íons bivalentes apenas quando ligado ao RGD (Arg-Gly-Asp) (Craig *et al.*, 2004).

As integrinas se ligam a uma variedade de ligantes, incluindo proteínas da ECM, proteínas plasmáticas e integrais de membrana (Hynes *et al.*, 1992) (Tabela 2). A preferência pelo ligante é determinada particularmente pela disponibilidade relativa da afinidade da integrina em dado microambiente e/ou estado específico conformacional do ligante (Plow *et al.*, 2000). No entanto, a maioria das proteínas extracelulares que se ligam às integrinas possuem a sequência de aminoácidos RGD, a qual promove ligação das células com proteínas da ECM (Karp, 2002) por meio de cadeias de polissacarídeos e glicosaminoglicanas, proteínas fibrosas de função estrutural como colágeno e elastina, e proteínas de função adesiva como fibronectina e laminina (Alberts *et al.*, 2010).

Grande parte das integrinas, como  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 11\beta 3$  e  $\alpha 3\beta 1$ , são capazes de reconhecer sequências RGD presentes em alguns componentes da matriz, tais como a fibronectina, a vitronectina e o fibrinogênio (Avraamides *et al.*, 2008). Outras integrinas, como  $\alpha 6\beta 1$  é capaz de reconhecer a pequena sequência peptídica ECD (Glu-Cys-Asp) presente nas laminina e colágenos (Mizejewski, 1999).

Enquanto algumas integrinas reconhecem seletivamente uma única proteína da ECM, outras podem se ligar a um ou a diversos ligantes. Do mesmo modo, proteínas da ECM podem se ligar a várias integrinas (Albeda *et al.*, 1990). Entretanto, essa característica não garante que proteínas, com essa sequência, possam ser reconhecidas por um mesmo receptor, o que leva a considerar a probabilidade de que sejam sequências vizinhas ao RGD e as diferentes conformações tanto dos sítios adesivos, como dos rearranjos conformacionais que definem tal especificidade (Dzamba *et al.*, 2001).

**Tabela 2:** Ligantes de integrinas (Petruzelli *et al.*, 1999; Barkzyc *et al.*, 2010).

Integrina		Ligante
$\alpha 1$	$\beta 1$	Colágeno; Laminina
$\alpha 2$		Colágeno; Laminina
$\alpha 3$		Colágeno; Laminina; Fibronectina
$\alpha 4$		Fibronectina; VCAM-1
$\alpha 5$		Fibronectina
$\alpha 6$		Laminina
$\alpha 7$		Laminina
$\alpha 8$		Osteopontina; Vitronectina; Fibronectina; Nefronectina
$\alpha 9$		Tenascina-C; VEGF-C; VEGF-D
$\alpha 10$		Colágeno
$\alpha 11$		Colágeno
$\alpha V$	$\beta 2$	Fibronectina; Vitronectina; Osteopontina
$\alpha L$		ICAM-1; ICAM-2; ICAM-3
$\alpha M$		C3b; Fibrinogênio; Fator X; ICAM-1; Fibronectina
$\alpha X$		C3b; Fibrinogênio
$\alpha D$	ICAM-3; VCAM-1	
$\alpha IIb$	$\beta 3$	Fibronectina; Fibrinogênio; Fator de von <i>Willebrand</i> ; trombospondina, Vitronectina
$\alpha V$		Osteopontina; Colágeno
$\alpha 6$	$\beta 4$	Laminina
$\alpha V$	$\beta 5$	Fibronectina; Vitronectina
$\alpha V$	$\beta 6$	Fibronectina; TGF- $\beta$ -LAP
$\alpha 4$	$\beta 7$	Fibronectina; MadCAM-1; VCAM-1
$\alpha E$		E-caderina
$\alpha V$	$\beta 8$	Fibronectina; VCAM-1; Laminina; TGF- $\beta$ -LAP

#### 1.4.1 A laminina como matriz extracelular

As lamininas são glicoproteínas heterodiméricas formadas por subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , originando uma molécula com três braços curtos e um longo. A união de cinco cadeias diferentes de  $\alpha$ , três cadeias de  $\beta$  e três cadeias de  $\gamma$ , com 400, 200 e 200kDa respectivamente, originam tanto em humanos quanto em murinos, 16 heterodímeros de laminina (Aumailley *et al.*, 2005). Estes heterodímeros formam uma porção integral da rede de suporte da membrana basal em quase todos os tecidos animais e de matrizes extracelulares encontradas entre camadas celulares, classicamente conhecida no

sistema imune por estar envolvida na diferenciação, migração e ativação de linfócitos (Savino *et al.*, 2003). Várias interações do sistema linfo-hematopoiético responsáveis pelos eventos citados são mediadas por receptores de superfície celular da família das integrinas, por distroglicanas, por um receptor da tirosina fosfatase, persulfatos de heparana entre outros (Silva-Barbosa; Savino, 2000).

A integrina  $\alpha 6\beta 1$  é formada da associação heterodimérica da subunidade  $\alpha 6$  com subunidade  $\beta 1$ , de modo que se tornam um dos receptores majoritários para as isoformas de laminina 1, 2, 5, 8, 10 e 11 (Givant-Horwitz *et al.*, 2005) as quais compartilham as mesmas cadeias  $\beta 1$  e  $\gamma 1$  (Schaff *et al.*, 2013) expressas na ECM (Chung *et al.*, 2004). Contudo, de acordo com Schaff *et al.* (2013), a subunidade  $\alpha$  das lamininas exerce um papel crucial na adesão plaquetária possivelmente devido ao fato de que essa subunidade carrega nas regiões carboxil-terminal os principais domínios que interagem com receptores celulares, incluindo a integrina  $\alpha 6\beta 1$  (Tabela 2).

Por associação à  $\alpha 6\beta 1$ , a laminina é capaz de promover migração e crescimento de neurite dos neurônios sensoriais olfatórios *in vitro* (Calof *et al.*, 1994) bem como contribuir na formação de trombos *in vivo* em camundongos (Shaff *et al.*, 2013). A ligação da laminina à integrina  $\alpha 6\beta 1$  também desempenha um papel importante na determinação do fenótipo agressivo de células tumorais durante o processo metastático (Sroka *et al.*, 2011) haja vista que a integrina  $\alpha 6\beta 1$  em macrófagos é regulada por estímulos inflamatórios (Shaw, Mercúrio, 1989) e, conseqüentemente, estes processos inflamatórios conduzem um microambiente pró-tumoral (Allavena *et al.*, 2008; Becker *et al.*, 2013).

### **1.5 Adesão e movimentação celular promovidas pela sinalização por integrinas**

As interações entre célula e ECM participam do controle de diferenciação celular, morfogênese, proliferação e migração. Então, conseqüentemente, impacta em processos como embriogênese, cicatrização, inflamação e câncer (Jones; Walker, 1999). No entanto, compreender a migração celular é um desafio, porque é o resultado da transição, da adesão localizada e da sinalização envolvida (Huttenlocher; Horwitz, 2011).

Muitas dessas interações com a ECM são mediadas pelas integrinas, que pertencem à família de moléculas de adesão celular. Além da função de adesão, as integrinas são hoje reconhecidas moléculas de sinalização capazes de realizar a transdução de mensagens por vias de sinalização clássica. Desse modo, a função das

integrinas pode ser considerada como um modulador chave do comportamento celular (Jones; Walker, 1999).

A ligação ao substrato e, conseqüentemente os eventos de sinalização transmembranar estão envolvidos com o metabolismo celular, proliferação e longevidade, motilidade e ainda, a manutenção das funções específicas de diferenciação celular. Isso vem sendo bem demonstrado em diferentes tipos celulares, principalmente quando associadas à ECM. Como por exemplo, o colágeno, que permite a manutenção do fenótipo celular e de níveis de função metabólica, durante longos períodos em cultura (Crossin; Krushel, 2000).

Em alguns casos, as integrinas se ligam a diferentes regiões do ligante, tal como as integrinas  $\alpha 4\beta 1$  e  $\alpha 5\beta 1$  fazem (Guan; Hynes, 1990), enquanto que em outros casos, as integrinas se ligam à mesma região da proteína, por exemplo, a ligação de  $\alpha 5\beta 1$  e  $\alpha 3\beta 1$  em fibronectina (Elices *et al.*, 1991). Essas interações entre os receptores específicos e diferentes locais de ligação do ligante são capazes de promover a comunicação entre as células, sugerindo que as integrinas funcionam como mais do que meras moléculas adesivas (Kim *et al.*, 2011).

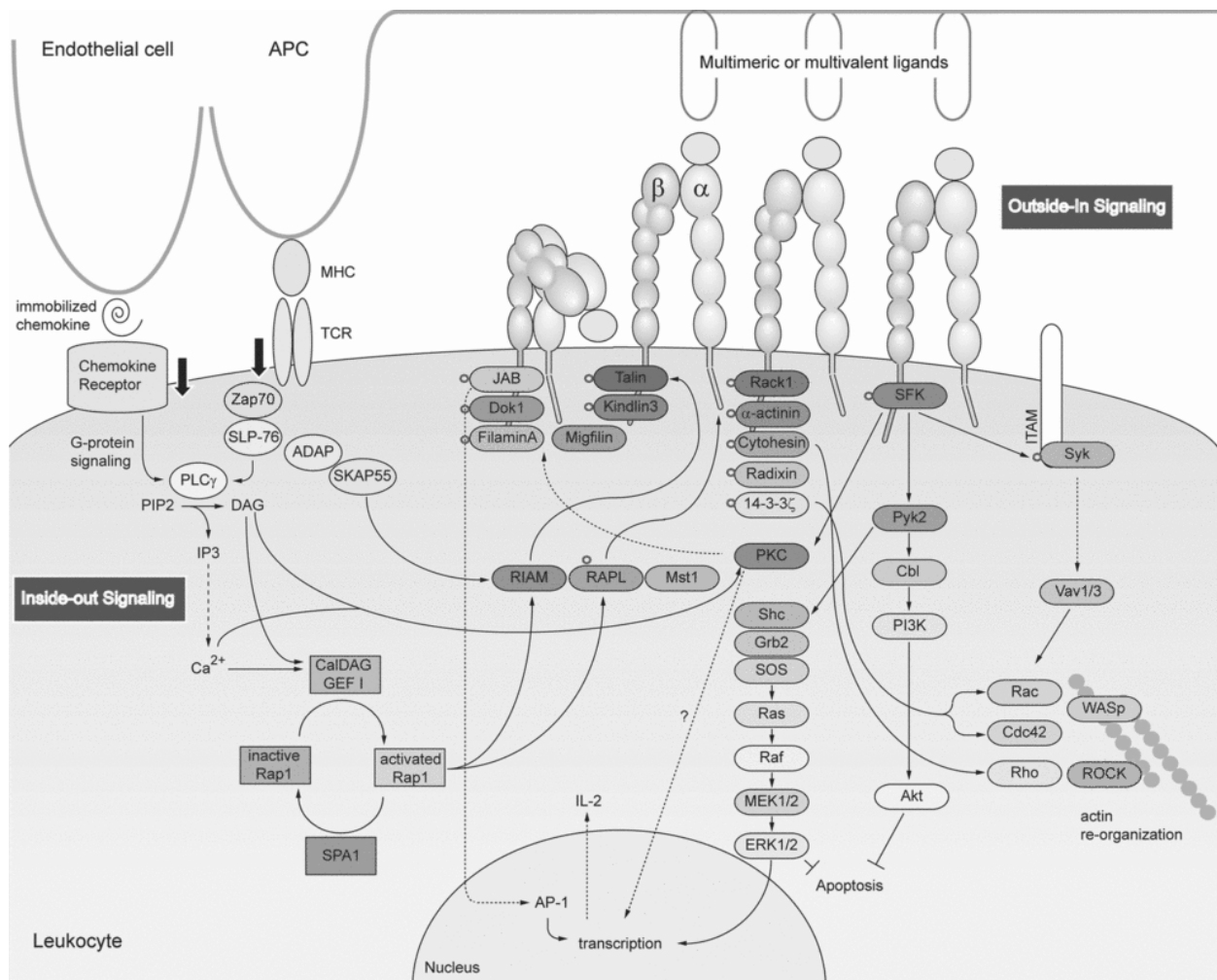
As integrinas estão bem adaptadas para a transmissão de informações do meio extracelular para dentro da célula. E isso se deve a sua estrutura molecular onde os domínios citoplasmáticos das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  das integrinas são capazes de interagir com o citoesqueleto de diferentes modos e assim, proporcionar uma variedade de respostas celulares que poderiam ser iniciadas por meio da ligação de até mesmo um único ligante (Jones; Walker, 1999).

Durante a ligação com a ECM, as integrinas se agrupam na base da membrana celular, processo denominado *clustering* de integrinas, e se associam a um complexo sinalizador que promove a organização dos filamentos de actina em fibras maiores, o que acarreta em um maior agrupamento de integrinas, reforçando assim sua ligação à ECM, em um sistema de *feedback* positivo (Giancotti; Rouslahti, 1990). E assim, são formadas as adesões focais, ou seja, agregados de proteínas da ECM, integrinas e proteínas do citoesqueleto organizados de cada lado da membrana (Lo; Chen, 1994; Giancotti; Rouslahti, 1990; Burridge, Chrzanowska-Wodnicka, 1996) que são caracteristicamente dinâmicos e iniciam o processo de sinalização celular (Giancotti; Rouslahti, 1990; Schwartz, 2001; Humpries *et al.*, 2003).

Estes sítios de adesão focal proporcionam mudanças conformacionais dentro dos domínios citoplasmáticos, provocadas por meio de eventos de fosforilação ou

desfosforilação, e permitem a associação de outras proteínas que podem regular a atividade do estado da integrina (Dedhar; Hannigan, 1996). Esta habilidade das integrinas em controlar sua afinidade por ligantes é crucial para a adesão celular e é conhecida como sinalização *inside-out* (Hynes, 1999), ou seja, a atividade de ligação extracelular das integrinas é regulada internamente na célula, podendo transmitir sinais através da membrana celular em ambas as direções (Williams *et al.*, 1994). Por outro lado, a ligação de proteínas da ECM às integrinas promove sinais que são transmitidos para o interior da célula, caracterizando a sinalização *outside-in* (Williams *et al.*, 1994).

Depois de ativadas, as integrinas podem apresentar um vasto repertório de mecanismos de transdução de sinais, tais como os de ativação de GTPases que levam a mudanças na organização do citoesqueleto, ativação de vias de sinalização da MAPK (*mitogen activated protein kinase*) e ativação de uma variedade de proteínas quinase, o que pode então influenciar a expressão gênica (Zhu; Assoian, 1995). Ainda, a ativação das integrinas pode resultar na liberação de lipídios como mensageiros secundários e alterar os níveis intracelulares de cálcio e os valores de pH (Laflame; Auer, 1996).



**Figura 5:** Sinalização por integrinas e a inter-relação com demais vias de sinalização (Tan, 2012).



## 1.6 Eventos associados a sinalização por integrinas

A adesão celular promovida pelas integrinas apresenta duas funções principais na migração, a saber primeiramente: ela gera tração, ligando o substrato extracelular a fibrinogênio filamentos de actina e miosina e, organizando redes de sinalização (Huttenlocher; Horwitz, 2011) que podem ativar várias vias de sinalização de forma independente (Assoian; Schwartz, 2001). Mas, mais frequentemente, eles podem agir em sinergia com outros fatores, como por exemplo, fatores de crescimento (Alam *et al.*, 2007), receptores de insulina (Scheneller *et al.*, 1997), receptor de VEGF (*vascular endothelial growth fator*) (Rouslahti, 2002), receptor de TGF- $\beta$  (*transforming growth factor beta*) (Scaffidi *et al.*, 2004), receptor do HGF (*hepatocyte growth fator*) (Sridhar *et al.*, 2006) e receptor de EGF (*epidermal growth fator*) (Bill *et al.*, 2004), sendo todas as ligações mediadas pelos múltiplos domínios específicos presentes em cada proteína da ECM (Elices *et al.*, 1991).

Existem algumas etapas já descritas sobre a proliferação de sinais proporcionados pela interação entre integrinas e seus ligantes, principalmente envolvendo adesão, diferenciação e movimentação celular.

*A priori*, a adesão da integrina pode levar diretamente a ativação de FAK (*focal adhesion kinase*), a auto fosforilação decorrente da adesão celular e a interação com talina ou com outras proteínas do citoesqueleto (Guan, 1997). Seguido, ocorre a ativação da MAPK e de RAS (*GTPase*), ambos fortemente envolvidos na geração do sinal mitogênico (Haber *et al.*, 2001). Este princípio coloca a sinalização gerada pelas integrinas em um caminho paralelo e complementar aos eventos iniciados por fatores de crescimento como o EGF ou PDGF (*platelet-derived growth fator*) em que a ativação de uma quinase resulta, finalmente, em uma cascata de sinalização nuclear (Haber *et al.*, 2001).

Ainda há a ideia de que a ligação da integrina conduz a profundas alterações nos lipídios de membrana, o que afeta indiretamente o sinal proliferativo de fatores de crescimento, aumentando substrato para a PLC (fosfolipase C) e, conseqüentemente, aumentando o fosfatidilinositol bifosfato na membrana (Haber *et al.*, 2001).

Logo, a ativação da PLC por fatores de crescimento pode levar ao aumento da hidrólise de fosfolípidos de membrana e gerar inositol-1-4-5-trifosfato e diacilglicerol. O inositol-1-4-5-trifosfato ativa os canais de cálcio localizados na membrana do retículo endoplasmático promovendo aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol. O diacilglicerol, por sua vez, também produz o mesmo efeito sobre a concentração de

cálcio intracelular, ao ativar os canais de cálcio sensíveis à voltagem da membrana plasmática, permitindo a passagem do cátion do meio extracelular para o intracelular (Best *et al.*, 1984).

A sinalização mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  é bastante complexa na maioria das células, considerando o grande número de proteínas reguladas por este íon e as diversas formas de aumento na concentração intracelular. Haja vista que o efeito do íon  $\text{Ca}^{2+}$  sobre a expressão gênica é dependente tanto da intensidade como do local no qual seu aumento na concentração ocorre, sendo a cascata da ERK (*extracellular-signal-regulated kinases*) uma das vias responsáveis pela integração destes sinais (Lenz, 2000).

Com o aumento de íons  $\text{Ca}^{2+}$  há ativação da PCK (*protein kinase C*) (Haber *et al.*, 2001) a qual ativa proteínas de grânulos secretórios (como de insulina e citocinas) que, juntamente com o  $\text{Ca}^{2+}$ , promoverão a ativação do sistema de microtúbulos e microfilamentos, responsável pela translocação desses grânulos para as proximidades da membrana plasmática e consequente exocitose. Também há ativação da adenilato ciclase com o consequente aumento do conteúdo intracelular de AMPc (Best *et al.*, 1984). A indução da produção de AMPc ativa a PKA (*protein kinase A*), que parece agir nos processos de síntese proteica da célula (Haber *et al.*, 2001).

Na ausência de ligação de integrinas, como por exemplo, para adesão celular, embora PLC possa ser ativada por fatores de crescimento, na ausência de ligação ao substrato não há geração de um sinal proliferativo (Haber *et al.*, 2001).

Além das interações de integrinas estarem envolvidas em processos de adesão, também participam ativamente da movimentação celular, onde há polimerização de filamentos de actina cujas ligações regulam e são reguladas por moléculas de sinalização associadas à adesão (Mitra *et al.*, 2005). E, eventualmente, essas alterações na forma e motilidade das células também podem causar alterações na transcrição de genes, regulação da migração e diferenciação celular (Gieger *et al.*, 2009; Humphries *et al.*, 2007).

As integrinas funcionam de modo complexo dentro de vias de sinalização, de adesão, do citoesqueleto e desempenham papel fundamental no sistema hematopoiético, especialmente no sistema imune (Kumar, 1998). Mas, como todos os sistemas muito complexos, qualquer falha oferece maiores oportunidades de dano. Desse modo, aberrações na sinalização proporcionada pelas integrinas podem

contribuir para diferentes estados patológicos, como metástase, angiogênese e doenças inflamatórias (Haber *et al.*, 2001).

### 1.7 Participação das integrinas no sistema imune

As integrinas participam da adesão célula-matriz e célula-célula em muitos processos fisiologicamente importantes, incluindo desenvolvimento embrionário, hemostasia, trombose, processos imunológicos, mecanismos de defesa não imunes, oncogênese e também doenças genéticas humanas (Hynes, 1987).

Durante processos inflamatórios ou infecciosos, os leucócitos percorrem o sistema vascular por meio de uma cascata de acontecimentos que envolvem uma série de receptores de adesão e migração (Ley *et al.*, 2007). Logo, as integrinas desempenham um papel fundamental nesta cascata, mediando a retenção dos leucócitos no endotélio inflamado e coordenando a transmigração através da membrana basal para permitir o deslocamento ao local da infecção ou inflamação (Abram *et al.*, 2009).

A função adesiva das integrinas é regulada pela sinalização do tipo *inside-out* e, para que a função de adesão dos leucócitos seja normal, é essencial que o processo de adesão esteja totalmente regulamentado.

Em condições normais, os leucócitos e plaquetas não devem ser aderentes, pois precisam circular livremente na corrente sanguínea. Nos locais de inflamação ou infecção, os leucócitos necessitam da capacidade de reconhecer e aderir ao endotélio subjacente, rastejar através da parede do vaso sanguíneo e, em seguida, realizar a diapedese até o local com a homeostase perturbada (Brown *et al.*, 1996).

Para a conclusão bem-sucedida de todos estes eventos supracitados, a adesão das integrinas deve ser ativada e desativada sequencialmente e repetitivamente. Assim, a sinalização *inside-out* para ativação e desativação das integrinas é uma característica especialmente importante de integrinas de leucócitos.

Dois modos distintos de ativação são possíveis. Em caso de afinidade de uma integrina em particular ao seu ligante, resulta de uma alteração conformacional na integrina, devido à sua ativação, como demonstrado em  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  e  $\alpha\text{L}\beta\text{12}$  por meio de anticorpos monoclonais (mAb) que diferenciam o estado ativado a partir do estado de repouso da integrina (Brown *et al.*, 1996).

Tanto quimiotáxicos quanto citocinas são capazes de estimular as integrinas de modo que ocorra uma rápida conformação, tornando-as com maior afinidade ao ligante.

Permitindo assim, uma resposta mais rápida dos leucócitos durante processos inflamatórios (Abram *et al.*, 2009). Experimentalmente, a sinalização *inside-out* que promove a ativação de integrinas pode ser medida por meio da ligação específica de anticorpos a ligantes como ICAM (*Intercellular Adhesion Molecule*), a qual é aumentada nos estágios de migração celular pelo endotélio (Ley *et al.*, 2007).

As Rap GTPases tem sido demonstrada como grandes responsáveis pela regulação da sinalização *inside-out* nos linfócitos (Kinashi, 2005). A sinalização através da Rap1 transmite um sinal de dentro para fora para as integrinas, aumentando assim a aderência a ligantes, tais como proteínas da superfamília das imunoglobulinas, bem como proteínas de ECM e proteínas do plasma. Este processo induz a aderência de leucócitos ao endotélio e apresentação de antígenos pelas células. Além da regulação das integrinas, Rap1 ativada induz a polaridade celular de linfócitos, que é coordenada com redistribuição de LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*) na superfície celular (Katagiri; Kinashi *et al.*, 2012).

Logo, como demonstrado por Ghandour *et al.* (2007) a redução das proteínas Rap afeta negativamente a adesão celular mediada por VLA-4.

Na sinalização do tipo *outside-in* em células do sistema imune, as integrinas atuam juntamente com os sinais enviados por CD3 (*cluster of differentiation 3*) e, agem sinergicamente na ativação de FAK (Brown *et al.*, 1996; Hogg *et al.*, 2011). Isso ocorre após a interação do antígeno com o TCR (*T cell receptor*), onde o CD3 realiza a transdução de sinais por meio da fosforilação do GTP. O complexo formado pelo TCR e CD3 quando ativado faz com que o GTP transfira um radical fosfato para os aminoácidos tirosina dos polipeptídeos do CD3, que estando fosforilado vai ativar a enzima PLC. Essa enzima hidroliza o 4,5-bifosfato fostatidil-inositol em trifosfato inositol e diacilglicerol (Brown *et al.*, 1996). Conseqüentemente, há liberação de íons  $\text{Ca}^{2+}$  que ativam diversas quinases que fosforilam proteínas, as quais ativam a transcrição do RNAm para a síntese de interleucinas (Brown *et al.*, 1996), como a IL-2 por exemplo (Abbas *et al.*, 2008).

### **1.8 Participação das integrinas no câncer e metástases**

O câncer abrange por volta de seis capacidades biológicas durante o desenvolvimento de tumores humanos. Estas capacidades incluem: sustentar a sinalização para a proliferação, perder a capacidade de supressão de crescimento,

aumentar a resistência da morte celular, permitir a imortalidade da replicação, induzir angiogênese, realizar a invasão de tecidos e metástase (Hanahan; Weinberg, 2011).

Sabe-se que as células não existem no isolamento e necessitam interagir com diversos componentes da ECM. Frente a condições fisiológicas normais, os componentes da ECM apresentam-se regulados entre síntese e degradação. Contudo, em condições patológicas, como por exemplo o câncer, há aumento da síntese de certos componentes da ECM como laminina, fibronectina e colágeno (Zent; Pozzi, 2010). Também há aumento da degradação destes componentes de matriz gerando produtos clivados, os quais controlam o crescimento tumoral e metástase por meio do estímulo de crescimento de células neoplásicas, seguido de angiogênese e linfangiogênese (Zent; Pozzi, 2010).

As células associadas ao câncer tipicamente desenvolvem alterações em seu formato assim como no seu processo de adesão à outras células e a ECM (Hanahan; Weinberg, 2011). Logo, as integrinas, que estão presentes em eventos de adesão e migração, estão envolvidas na evolução do câncer e crescimento do tumor, progressão, invasão, metástase e transformação maligna (Desgrosellier; Cheresh, 2010).

Vários estudos têm mostrado o envolvimento de integrinas em tumores e processos metastáticos, como demonstrado por Bianchi-Smiraglia *et al.* (2013) que a subunidade de integrina  $\beta 5$  é altamente expressa por células de carcinoma mamário e, na presença de vitronectina, há expressão da integrina  $\alpha \nu \beta 3$ , o que leva a regulação positiva da atividade da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e da tradução do RNAm dependente de CAP, que conseqüentemente, reverte o efeito de hipóxia e facilita a invasão das células tumorais (Pola *et al.*, 2013). Lamb *et al.* (2011) sugerem o envolvimento da subunidade  $\beta 1$  e da via de sinalização de NF $\kappa$ B como mediadores críticos da progressão invasiva pós-irradiação ionizante.

Desse modo, Russo *et al.* (2013) sugerem que a prevenção da adesão de células tumorais na ECM é uma importante estratégia de inibição da propagação de células cancerígenas e indução de anoikis.

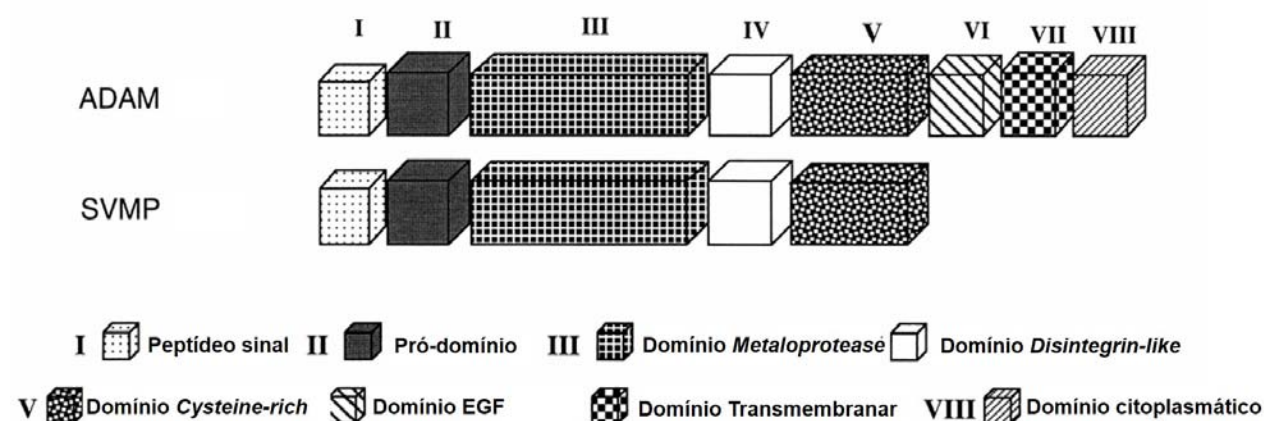
### **1.9 As desintegrinas bloqueiam a capacidade de interação das integrinas**

Utilizado pela primeira vez em 1989, o termo desintegrina descreve um grupo de peptídeos ricos em cisteína, derivados de venenos de serpentes e de massa molecular

entre 5 e 9kDa, os quais interagem com as integrinas presentes na superfície celular (Dennis *et al.*, 1989; Niewiarowski *et al.*, 1989).

São caracterizadas por uma estrutura modular constituída de um peptídeo sinal, pró-domínio, domínio metaloprotease, domínio *disintegrin-like*, e domínio *cysteine-rich*, comum ao grupo das metaloproteases de venenos de serpentes (SVMPs – *Snake Venom Metalloproteinases*) da classe P-III (Fox; Serrano, 2005). As desintegrinas são domínios pequenos em sua maioria e geralmente contém a sequência adesiva RGD (Huang; Ingber, 1999). A ligação reversível entre células e ECM, mediada por integrina, pode ser interrompida por estes pequenos peptídeos (Figura 6).

As desintegrinas apresentam homologia com proteínas expressas em diversos tecidos de mamíferos, e assim, atuam nos mais variados processos fisiológicos e patológicos. E, dentre essas proteínas estão as ADAMs (*A Disintegrin And Metalloprotease*).



**Figura 6:** Estrutura de domínio de ADAMs e SVMPs. Adaptado de Black e White (1998).

### 1.9.1 Proteínas ADAMs interagem com integrinas de forma específica

As ADAMs são uma família de proteínas da superfície celular as quais combinam características de moléculas de adesão e de proteases (Wolfsberg *et al.*, 1995). Sabe-se que 19 genes são responsáveis por codificá-las (Seals; Courtneidge, 2003), originando mais de 30 membros proteicos dessa família já descritos (Primakoff; Myles, 2000).

As ADAMs são metaloproteases dependentes de zinco, com sua sequência de aminoácidos significativa e organização de domínios semelhante ao das SVMPs (Wolfsberg *et al.*, 1995). A estrutura das ADAMs consiste em um peptídeo sinal, pró-domínio, domínio metaloprotease, domínio *disintegrin-like* e uma região rica em

cisteínas (domínio *cysteine-rich*). Além da estrutura das SVMPs, a maior parte das ADAMs também possuem domínio EGF, um domínio transmembranar seguido por uma cauda de domínio citoplasmático pelos quais estas proteínas estão localizadas em superfícies celulares (Wolfsberg *et al.*, 1995; Blobel, 1997) (Figura 6).

De acordo com sua estrutura, as ADAMs estão divididas em grupos das metaloproteases inativas e as metaloproteases ativas ou parcialmente ativas, pela presença da sequência consenso (HEXGHNLGXXHD) no sítio ativo do domínio metaloprotease, onde os três resíduos de *His* coordenam o íon  $Zn^{+2}$ . Contudo, a funcionalidade das ADAMs na adesão célula-célula encontra-se localizada no domínio *disintegrin-like* que reconhece ligantes do tipo integrina e, a especificidade desse reconhecimento é dada pelas características da sequência de um *loop* interativo similar ao das desintegrinas de veneno de serpentes (Seals; Courtneidge, 2003).

A diferença mais importante entre as ADAMs e as SVMPs reside no fato de que as primeiras são proteínas transmembrana, enquanto que as últimas são secretadas, apesar de formas solúveis de ADAMs já terem sido descritas (Loechel *et al.*, 2000). Outra diferença importante entre as ADAMs e SVMPs é que estas últimas são proteases ativas, enquanto que cerca da metade das ADAMs possui alterações nas suas sequências relacionadas ao zinco, o que resulta na ausência de atividade proteolítica (Black; White, 1998).

De acordo com Nath *et al.* (2000) e Bigler *et al.* (2000), a ADAM2 (Fertilin  $\beta$ ) e ADAM9 (Meltrin  $\gamma$ ) apresentam interação com integrinas  $\alpha 6\beta 1$  e estão envolvidas em processos autoimunes e de infiltração linfocitária. De modo semelhante pode ser visto com ADAM23, a qual possui interação com a integrina  $\alpha v\beta 3$  e pode estar envolvida no mecanismo de modulação da sua ativação e em processos metastáticos de câncer de mama e pulmão (Verbisck *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2012).

ADAM9 (Meltrin  $\gamma$ ) é uma proteína muito expressa nos tecidos de mamíferos e tem como substrato o HB-EFF (*heparin binding epidermal growth factor*) de células epiteliais. O seu domínio *disintegrin-like* contém um triplete ECD de interação com integrinas  $\alpha 6\beta 1$  e, desse modo, faz a mediação entre fibroblastos (Nath *et al.*, 2000). Logo, a ADAM 9 está envolvida na interação entre células de melanoma e fibroblastos, promovendo a invasão das células tumorais (Zigrino *et al.*, 2011).

ADAM2 (Fertilin  $\beta$ ) foi uma das primeiras ADAMs a ser descoberta e esta é uma glicoproteína envolvida na espermatogênese, fusão dos gametas e a sua expressão está relacionada à fertilidade (Myles; Primakoff, 1997; Hwang *et al.*, 2013), e esta

proteína apresenta uma sequência ECD no *loop* do domínio *disintegrin-like* capaz de interagir de modo direto ou indireto com a subunidade de integrina  $\alpha 6\beta 1$  (Bigler *et al.*, 2000) presente na membrana do ovócito (Myles; Primakoff, 1997). No entanto, não é clara qual a região do triplete compreende a região ativa de contato com o ligante nesta proteína (Bigler *et al.*, 2000).

Outras desintegrinas, por exemplo, a ADAM15 (metargidina humana), único membro descrito até o momento da família das ADAMs que possui a sequência tripeptídica RGD no domínio desintegrina (Kratzschmar *et al.*, 1996), apresenta interações notórias como mediar a adesão celular via integrinas  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha 5\beta 1$  e  $\alpha 9\beta 1$  (Zhang *et al.*, 1998; Nath *et al.*, 1999), assumindo papel importante na progressão do câncer de mama e de cólon (Ota *et al.*, 2012; Toquet *et al.*, 2012). Já a ADAM17, com suas propriedades adesivas, apresenta ação semelhante pela interação com  $\alpha 5\beta 1$ , mediando a interação das células de carcinoma com o seu microambiente (Trad *et al.*, 2013).

### **1.10 Peptídeos que interagem com integrinas atuam como modelos terapêuticos**

A diversidade das integrinas e o seu envolvimento em doenças complexas as tornam grandes alvos de terapias e drogas. Apesar da descoberta de inibidores altamente potentes, a completa inibição de integrinas não se torna viável, uma vez que há redundância na função e o desequilíbrio causado por sua completa inibição. Porém, a utilização de inibidores específicos pode provar ser mais eficaz em alguns casos.

A sequência RGD foi considerada a base para o desenvolvimento de antagonistas de integrinas. Até meados da década de 1990, as buscas por análogos da sequência RGD foram direcionadas para antagonistas não peptídicos de integrina  $\alpha 11\beta 3$ , os quais se demonstraram potentes, seletivos e com elevada biodisponibilidade oral, contribuindo para o tratamento de doenças tromboembólicas (Giannis; RübSam, 1997; Silva *et al.*, 2007).

Com o progresso das pesquisas e as descobertas sobre a importância da angiogênese para o crescimento e a metástase tumoral, o enfoque passou também para a obtenção de antagonistas seletivos da integrina  $\alpha v\beta 3$  (Giannis; RübSam, 1997), os quais já demonstraram efeitos diretos na prevenção da metástase, crescimento e angiogênese tumoral.

Atualmente já existem diversos antagonistas de integrinas envolvidos em estudos clínicos. Estes podem ser anticorpos humanizados, peptídeos sintéticos e



moléculas não peptídicas. Os alvos desses antagonistas são as regiões extracelulares das integrinas e conseqüentemente, interferem nos sítios de ligação.

Entre os anticorpos, pode ser citado como exemplo o Efalizumab (*Raptiva; Genentech*), o qual antagoniza a integrina  $\alpha L\beta 2$ , mais especificamente a subunidade  $\alpha L$ , foi utilizado desde 2003 para tratamento de psoríase. Contudo, casos de leucoencefalopatia multifocal progressiva associados ao uso de Efalizumab o fizeram ser retirado do mercado em 2009 (Major, 2010).

Também como representante dos anticorpos há o Natalizumab (*Tysabri; Elan/Biogen-Idec*), que antagoniza a subunidade  $\alpha 4$  das integrinas e é usado para tratar esclerose múltipla e doença de Crohn desde 2004. Contudo, devido a sua associação com leucoencefalopatia multifocal progressiva e propriedades imunossupressivas, foi retirado do mercado em 2005. Porém, em 2006 voltou ao mercado (com aviso de seus riscos na bula) devido a sua grande eficácia e baixa taxa de recidivas nos pacientes e, até então, tem demonstrado resultados substancialmente eficazes para o tratamento dessas doenças (Rudick; Panzara, 2006; Cox *et al.*, 2010).

Ainda, entre os anticorpos como inibidores de integrinas, há o Etaracizumab ou Abegrin (anticorpos MEDI-522 - *MedImmune*) que são específicos para a integrina  $\alpha v\beta 3$ , que está associada ao câncer altamente metastático. Sendo assim, esses anticorpos são utilizados para o tratamento de melanoma e tumores sólidos (Hersey *et al.*, 2010). Os anticorpos MEDI-522 ainda estão sendo testados e já se encontram em fase III (Cox *et al.*, 2010), ou seja, já estão em estudos clínicos de larga escala para demonstrar eficácia e segurança a fim de estabelecer perfil e vantagem terapêutica.

Como antagonista não peptídico pode ser citado como exemplo o Tirofiban (*Aggrastat; Merck*), que inibe especificamente  $\alpha IIb\beta 3$  e conseqüentemente a agregação plaquetária. Este é administrado por via intravenosa e é utilizado em pacientes com síndromes coronárias agudas e aqueles submetidos intervenção coronária percutânea, uma vez que é capaz de reduzir o risco de eventos isquêmicos (Bonaca *et al.*, 2009). No entanto, apesar das expectativas iniciais de que os antagonistas voltados para a integrina  $\alpha IIb\beta 3$  seriam drogas bloqueadoras, as tentativas de desenvolver antagonistas que seriam administrados por via oral (para administração mais conveniente) não foram bem-sucedidas. Então, a utilização do Tirofiban e de outros inibidores intravenosos são aprovados com restrição, ou seja, apenas aos pacientes de alto risco (Cox *et al.*, 2010).

Ainda como antagonista não peptídico há o Valategrast (*Roche*), o qual inibe  $\alpha 4\beta 1$  e é usada no tratamento de asma a fim de coibir a infiltração leucocitária (Abram *et al.*, 2009). Apesar de ter demonstrado eficácia no tratamento oral da asma e ter chegado a fase II de testes clínicos, ou seja, estudos controlados em pacientes para demonstrar efetividade potencial da medicação, o Valategrast foi retirado do mercado na mesma época que o Natalizumab devido à variadas reações adversas (Arosio *et al.*, 2012).

O Cilengitide (*Merck*) e Eptifibatide (*Integrilin; MillenniumPharmaceuticals/Merck*) são representantes de antagonistas peptídicos.

O Eptifibatide inibe as integrinas  $\alpha v\beta 3$  e  $\alpha IIb\beta 3$  e é utilizado para inibir a agregação plaquetária, sendo liberado o uso apenas para pacientes de alto risco pois sua administração depende de supervisão, uma vez que é intravenosa (Cox *et al.*, 2010).

O Cilengitide recentemente entrou em fase III de testes clínicos (Cox *et al.*, 2010; Stupp *et al.*, 2014) e tem como alvo principal inibir receptores de integrinas do tipo  $\alpha v\beta 3$  e  $\alpha v\beta 5$ , tendo a capacidade de inibir a adesão celular e induzir a apoptose (Reardon; Cheresch, 2011). Atualmente é utilizado para tratamento de pacientes com glioblastoma ou outros tipos de câncer no encéfalo. A determinação da estrutura cristalina do segmento extracelular da integrina ligada ao ciclopentapeptídeo Cilengitide foi um marco importante para identificar quais seriam seus ligantes específicos (Mas-Moruno *et al.*, 2010).

### 1.10.1 O peptídeo A9(x)

Devido a participação das integrinas em diversos fatores fisiológicos e patológicos (Chung *et al.*; 2004), os peptídeos são considerados promissores agentes terapêuticos no tratamento de câncer, diabetes e doenças autoimunes e cardiovasculares, podendo ser utilizados de maneiras diferentes para o tratamento. Em geral, os peptídeos possuem muitas vantagens, tais como tamanho pequeno, facilidade de síntese e de modificação, além de boa biocompatibilidade (Borghouts *et al.* 2005).

Logo, baseado no *loop* interativo das ADAMs, família de proteínas da superfície celular as quais combinam características de moléculas de adesão e de proteases (Wolfsberg *et al.*, 1995), foram desenvolvidos *in silico* modelos moleculares capazes de modular a adesão, invasão e migração de macrófagos murinos (Ferraz *et al.*, em publicação; Fernandez *et al.*, 2007). Esses modelos peptídicos se utilizam da

característica do domínio *disintegrin-like* presente nas ADAMs, o qual reconhece de modo específico as integrinas devido à característica sequência do *loop* interativo similar ao das desintegrinas de veneno de serpentes (Seals; Courtneidge, 2003).

De acordo com a sequência do *loop* interativo das ADAMs, os modelos de peptídeos cíclicos resultam do *crosslink* de cisteínas e da ADAM9. Previamente aos experimentos *in vitro*, o modelo molecular do complexo ligante de integrinas foi submetido a experimentos *in silico*, como *docking*, estudo de estruturas candidatas, dinâmica molecular e avaliação dos candidatos à síntese (Fernandez *et al.*, 2007; Coronado, 2008). A partir desses experimentos, os peptídeos cíclicos foram sintetizados com 15 aminoácidos e 98% de pureza pela *Genscript*. Os diferentes peptídeos receberam nomenclaturas alfanuméricas. O peptídeo A9a foi o escolhido para ser utilizado nesse estudo devido a sua especificidade de interação *in silico* com a integrina  $\alpha 6\beta 1$  (Fernandez *et al.*, 2007; Coronado, 2008).

Logo, o estudo sobre bases moleculares de migração envolvendo a interação de integrinas e peptídeos cíclicos com alta especificidade podem ser capazes de proporcionar desenvolvimento de conhecimentos sobre a interação peptídeo/integrina e sugerir novas abordagens terapêuticas.

### **1.11 O papel dos macrófagos no estudo das integrinas**

Muitas integrinas são receptores predominantemente ou exclusivamente de proteínas da ECM, como a fibronectina, laminina e colágeno. No entanto, outras integrinas também têm um papel importante na adesão celular heterotípica, mais notavelmente em células do sistema imune, os leucócitos, onde as integrinas se ligam a receptores de Ig-SF (ICAM, VCAM-1, MAdCAM-1) ou de caderina ( $\alpha E\beta 7$ - E-caderina) (Ramage, 2012).

Os macrófagos são células do sistema imune inato com papéis essenciais na resposta primária contra patógenos invasores, homeostase dos tecidos, apresentação de antígenos *self* e *non-self* e, após a infecção ou lesão, a resolução da inflamação e cicatrização de feridas e no desenvolvimento e remodelamento de órgãos (Murray; Wynn, 2011; Wynn *et al.*, 2013). Essas células também podem apresentar uma alta capacidade bactericida e tumoricida e liberar moléculas anti-inflamatórias (Tang, 2013) como também essas funções reparadoras e homeostáticas podem ser subvertidas por injúrias crônicas, resultando em uma associação causal de macrófagos à estados fisiopatológicos (Wynn *et al.*, 2013).

Os macrófagos também são as células mais abundantes do sistema imune associados à tumores (Balkwill; Mantovani, 2001; Ries *et al.*, 2014), compreendendo cerca de 50 a 80% da massa tumoral (Allavena *et al.*, 2008), os quais auxiliam na progressão e no espalhamento tumoral por meio de diversos mecanismos (Noy; Pollard, 2014). Desse modo, os macrófagos causam impacto no prognóstico do câncer de próstata, da mama, de pulmão, bem como pâncreas (Lissbrant *et al.*, 2000; Qian *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013; Yoshikawa *et al.*, 2012) e metástases de cancro (Bonapace *et al.*, 2014). Além disso, há relatos que indiquem que a carcinomas invasivos contém um grande número de macrófagos associados à tumores (Yoshikawa *et al.*, 2012) em comparação com carcinomas não-invasivos (Zhang *et al.*, 2013).

As integrinas presentes nos macrófagos são controladas, em geral, por processos inflamatórios (Shaw; Mercurio, 1989), tais processos inflamatórios podem ser capazes de formar um microambiente pró-tumoral (Allavena *et al.*, 2008). Tal fato impulsionou o desenvolvimento de drogas que interagem com macrófagos diminuindo a sobrevivência (DeNardo *et al.*, 2011; Ries *et al.*, 2014), bloqueando a adesão e invasão (Quian *et al.*, 2011) ou reduzindo sua função pró-tumoral (De Palma; Lewis, 2013).

Logo, a linhagem de células de sarcoma de *Mus musculus* transformadas e isoladas de ascites, sendo também designadas como macrófagos J774A1, tem sido amplamente utilizada como um modelo *in vitro* de macrófagos saudáveis para estudos de infecção celular (El Aamri *et al.*, 2015), respostas inflamatórias (Vazeille *et al.*, 2015), metástases (Low *et al.*, 2015) bem como nos estudos de integrinas (Yoshida *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2013; Vadali; Post, 2014; Zamani Taghizadeh Rabe *et al.*, 2014).

## 2 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a movimentação celular mediada por moléculas específicas localizadas nas superfícies das membranas celulares, que são chamadas de moléculas de adesão celular (CAM) entre elas as integrinas, constituem importante fator no desenvolvimento de metástase, nos processos autoimunes (Smerling *et al.*, 2007; Desgrosellier; Cheresch, 2010) e na isquemia cerebral (Avraamides *et al.*, 2008) e nos processos inflamatórios em geral. Durante as etapas do processo inflamatório e metastático, as células dependem da habilidade de interagir com proteínas da ECM e integrinas para regular tanto a migração quanto adesão celular. Por essa razão, regular a migração e a movimentação celular na ECM se torna uma importante estratégia para inibir a metástase por exemplo e induzir anoikis (Russo *et al.*, 2013).

Os macrófagos exibem uma plasticidade notável e podem mudar a sua fisiologia em resposta a estímulos ambientais, alterando seu fenótipo e sua fisiologia para as respostas imune inata e adaptativa (Mosser *et al.*, 2008). Logo, são considerados importantes células imunes efetoras por sua alta capacidade bactericida e por liberar moléculas anti-inflamatórias (Tang, 2013). De acordo com De Marzo *et al.* (2007), a capacidade de participar ativamente em inflamações crônicas tornam os macrófagos maiores contribuidores da formação tumoral, progressão (Noy; Pollard, 2014) e metástase (Bonapace *et al.*, 2014), como observado em múltiplos tipos de câncer, por exemplo de próstata em camundongos idosos onde é iniciado por grande infiltração macrófagica (Bianchi-Frias *et al.*, 2010).

Sabe-se que a ligação entre laminina e a integrina  $\alpha 6 \beta 1$  em macrófagos é regulada por estímulos inflamatórios (Shaw; Mercurio 1989) os quais podem proporcionar um microambiente tumoral (Allavena *et al.*, 2008). Logo, considera-se os macrófagos grandes alvos para terapias inflamatórias e tumorais (Becker *et al.* 2013). Contudo, nenhum estudo até o momento evidenciou o desenvolvimento de inibidores específicos e efetivos para  $\alpha 6 \beta 1$  e macrófagos.

O estudo de agentes proteicos menores e menos imunogênicos baseados na estrutura das desintegrinas presentes nos venenos de serpentes podem ser desenvolvidos e utilizados como agentes terapêuticos uma vez que possuem especificidade de ligação às integrinas e conseqüentemente, são capazes de se ligar e interferir nas funções celulares por meio de diferentes transduções de sinais. Desta forma, abordagens terapêuticas visando bloquear o recrutamento de macrófagos para

o sítio de lesão por meio de inativação de integrinas têm demonstrado eficácia em modelos animais como foi sugerido por Dietrich *et al.* (2007) em murinos acometidos por hemangiogênese e linfangiogênese inflamatória em córnea, nos quais análises imuno-histoquímicas revelaram que quando a subunidade  $\alpha 5$  é inibida por pequenas moléculas antagonistas de integrinas, pode-se observar o bloqueio significativo do crescimento de novos vasos linfáticos na córnea de uma forma dose-dependente.

Outro exemplo de ação de antagonistas de integrinas foi demonstrado por Lund *et al.* (2013), onde as integrinas  $\alpha V$ ,  $\alpha 4\beta 1$  e  $\alpha 9\beta 1$  interagem com osteopontina através da ligação no domínio RGD e SLAYGLR (Ser-Leu-Ala-Tyr-Gly-Leu-Arg), desempenhando um papel fundamental na biologia dos macrófagos, regulando a migração, sobrevivência e acumulação destas células em patologias inflamatórias crônicas.

Devido à importância dos sinais mediados pela interação integrina-receptor no processo de migração celular (Smerling *et al.*, 2007), o estudo sobre a interação das integrinas com diferentes proteínas deve ser enfatizado a fim de se obter agentes peptídicos que possuem a especificidade de ligação às integrinas, como os tipo-desintegrina. E, conseqüentemente, tenham capacidade de se ligar e interferir nas funções celulares como adesão, migração e proliferação celular, atribuindo atividade modulatória.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar os processos de adesão, migração e proliferação da linhagem J774A1 *in vitro* frente ao peptídeo cíclico específico e seletivo A9a identificando as integrinas presentes na linhagem de macrófagos de camundongos sob condições controle e dose-dependente de A9a.

#### 3.2 Objetivos específicos

- I. Testar a capacidade estimulatória e/ou inibitória da migração celular *in vitro* por meio de testes de adesão, cicatrização e migração de células de macrófagos da linhagem J774A1 frente ao peptídeo A9a;
- II. Determinar as concentrações ideais de peptídico cíclico A9a capazes de promover alterações na adesão, migração e proliferação celular;
- III. Determinar a presença de subunidades de integrinas  $\alpha_6$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_V$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_3$  na linhagem J774A1 de macrófagos;
- IV. Identificar e quantificar a expressão de integrinas envolvidas na migração e adesão celular em condições controle e frente ao peptídeo cíclico A9a;
- V. Verificar a ação da interação do peptídeo cíclico A9a na expressão das subunidades de integrinas, especialmente frente a integrina  $\alpha_6\beta_1$ ,

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia foi agrupada em dois tópicos principais: 4.1 Biologia Celular e 4.2 Biologia Molecular.

### 4.1 Biologia Celular

#### 4.1.1 Cultura e manutenção de macrófagos

Macrófagos de camundongo da linhagem J774A1 foram gentilmente cedidos pelo professor Renato A. DaMatta (LBCT-CBB-UENF). Estas células foram cultivadas em garrafas médias com DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Sigma*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, sendo o meio de cultura trocado a cada 2 dias.

Os repiques celulares foram realizados sempre que as culturas atingiam confluência, com auxílio de solução de tripsina estéril a 0,25%.

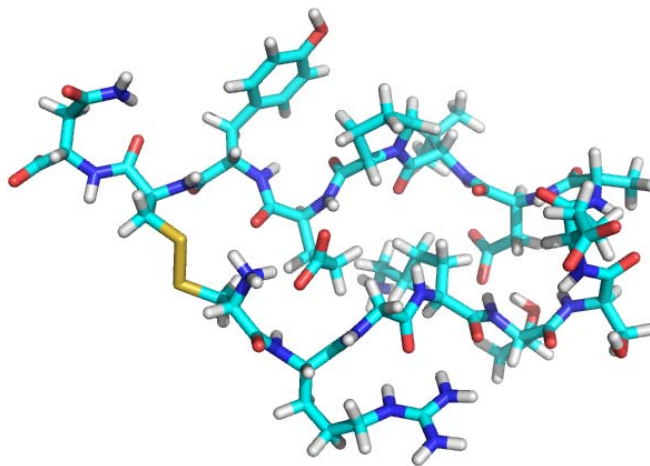
#### 4.1.2 Peptídeo cíclico

Um conjunto de peptídeos cíclicos que resultam do *crosslink* de cisteínas e da ADAM9 foram previamente desenhados *in silico* com intuito de desempenhar atividade de um potente antagonista/competidor do sítio de ligação de integrinas com a matriz (Fernandez *et al.*, 2007; Coronado, 2008).

Estudos prévios de modelagem molecular do complexo integrina-ligante foram realizados seguido por experimentos de *docking*, estruturas candidatas, dinâmica molecular e a escolha dos candidatos (Fernandez *et al.*, 2005; Fernandez *et al.*, 2007). Os peptídeos receberam nomenclaturas alfanuméricas como A9a, o qual foi escolhido para ser utilizado nesse estudo devido a sua especificidade *in silico* pela integrina  $\alpha 6\beta 1$  (Figura 7) (Fernandez *et al.*, 2007; Coronado, 2008).

Este peptídeo cíclico A9a foi então sintetizado pelo *Genscript* contendo 15 aminoácidos e 98% de pureza. E, para a aplicação de A9a nos experimentos foram realizadas diluições em tampão fosfato-salino (PBS) estéril.





**Figura 7:** Demonstração do peptídeo cíclico A9a. Adaptado de Fernandez *et al.* (2007).

#### 4.1.3 Teste de adesão celular

Placas de 96 poços com fundo chato (*Costar*) foram incubadas *overnight* a 4°C com 10µg/mL de laminina (*Sigma - Aldrich*) diluída em PBS estéril. Os controles negativos foram estabelecidos com poços previamente recobertos por 10µg/mL de laminina (*Sigma - Aldrich*) diluídos em PBS estéril sem adição do peptídeo cíclico A9a e com 50µM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), representando as interações dependentes de íons, ou seja, como as interações demonstradas pelas integrinas.

Para examinar as diferentes interações com o peptídeo cíclico no processo de adesão celular, foram adicionados 0,1nM, 0,15nM, 0,20nM, 0,25nM, 0,75nM, 1nM, 10nM, 25nM, 75nM, 100nM e 1000nM do peptídeo cíclico A9a previamente desenhado, com repetições em sextuplicata. Em seguida, foram plaqueadas  $2,5 \times 10^5$  células por poço e então, incubadas por 2hs a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Após o período de incubação, todas as células não aderentes foram retiradas e cada poço lavado gentilmente com PBS por 3 vezes. Logo, as células aderidas foram fixadas com glutaraldeído (*Sigma*) 5% e, incubados por 30min. Os poços foram subsequentemente lavados 3 vezes com PBS a fim de remover todo excesso de glutaraldeído. As células aderidas foram coradas com cristal violeta (*Vetec*) 0,1% e incubadas por 45min. Posteriormente, cada poço foi lavado 3 vezes com 400µL de PBS. E, finalmente, o corante foi solubilizado com ácido acético 10% e incubado a temperatura ambiente por 5min.

A absorbância foi medida a 570nm em leitor de microplaca (*Gene5 Microplate Data Collection*) e então, a média dos valores de adesão ainda obtidos no controle

negativo (EDTA) foram subtraídos dos demais valores uma vez o intuito é apenas apresentar a ação do peptídeo A9a sobre a relação integrina-ligante com a participação de íons bivalentes. Logo, foi montada a curva para determinação dos padrões de adesão celular dependente de integrinas na presença de A9a.

#### **4.1.4 Demonstração de concentrações inibitórias 50% (IC<sub>50</sub>)**

Neste ensaio foi avaliada a concentração de A9a necessária para ocasionar 50% da inibição da adesão celular. Para isso, foi realizada a metodologia do teste de adesão supracitado, construindo uma curva de adesão dose-dependente com as concentrações 0,1nM, 0,15nM, 0,20nM, 0,25nM, 0,75nM, 1nM, 10nM, 25nM, 75nM, 100nM e 1000nM do peptídeo cíclico A9a.

Os controles foram realizados em poços previamente recobertos por 10µg/mL de laminina (*Sigma - Aldrich*) diluídos em PBS estéril sem adição do peptídeo cíclico A9a.

#### **4.1.5 Ensaio de MTT**

O ensaio de MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium)) foi realizado de acordo com Mosmann (1983) ajustado para o tempo de 48hs.

Neste ensaio,  $2,5 \times 10^5$  macrófagos da linhagem J774A1 por poço foram incubados em sextuplicata juntamente a 0,1nM, 1nM, 10nM, 100nM e 1000nM de A9a em placas de 96 poços com fundo chato (*Costar*) previamente recobertos por 10µg/mL de laminina (*Sigma - Aldrich*) diluídos em PBS estéril por 44hs. Os controles foram realizados em poços previamente recobertos por 10µg/mL de laminina (*Sigma - Aldrich*) diluídos em PBS estéril sem adição do peptídeo cíclico A9a.

Foram então adicionados em cada poço 0,5mg/mL de MTT e incubado pelo período de 4hs, totalizando 48hs de incubação. Após este período, o sobrenadante foi retirado e adicionado a cada poço 130µL da mistura de isopropanol e ácido clorídrico (20mL:162 µL) e realizada a quebra dos cristais em cada poço.

Após centrifugação por 5min (1500rpm a 20°C), 80µL do sobrenadante foi retirado e a absorbância foi medida a 570nm em leitor de microplaca (*Gene5 Microplate Data Collection*) para verificar a formação de cristais de formazan.

#### **4.1.6 Ensaios de migração *in vitro* – Transwell**

Membranas de 6,5mm de diâmetro com filtro de porosidade de 0,8µm (*Corning Costar*) foram incubadas *overnight* com solução contendo laminina a 10µg/mL. Posteriormente, o excesso de material foi retirado e então  $2,5 \times 10^5$  células que ficaram

24hs prévias em meio isento de SFB foram dispostas sobre a membrana. Foi adicionado junto às células 0,1nM, 10nM e 100nM do peptídeo A9a e incubado por 6hs a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. No poço foram adicionados 600µL de DMEM suplementado com 10% de SFB.

Conseqüentemente, as células que migraram foram recolhidas na parte inferior da membrana do *transwell*. As membranas foram fixadas com glutaraldeído 5% e, coradas com cristal violeta 0,1% por 30min. As membranas foram lavadas com PBS por 3 vezes, deixadas secar e posteriormente, quantificadas utilizando microscópio invertido.

#### **4.1.7 Ensaio de cicatrização**

Placas de cultura de 24 poços (*Costar*) foram incubadas *overnight* a 4°C com 10µg/mL de laminina. Após esta etapa, 5x10<sup>5</sup> células da linhagem J774A1 foram plaqueadas por poço e cultivadas com DMEM suplementado com 10% de SFB a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>, a fim de atingir 100% de confluência. As monocamadas foram cuidadosamente lesadas utilizando uma ponteira de 20µl (amarela) estéril e os debris celulares foram retirados por lavagem com PBS estéril. Foram adicionados 1nM e 100nM do peptídeo cíclico A9a.

A recuperação das culturas foi acompanhada por fotografias dos locais lesados no momento inicial (0h) e após 6, 24, 30 e 48hs utilizando o programa *AxionVision 4.8* (*Zeiss*). As imagens foram comparadas entre si de acordo com a concentração de peptídeo recebido, sendo realizada a contagem de células no local da lesão por meio do programa *ImageJ*.

#### **4.1.8 Análises estatísticas**

Os resultados obtidos foram analisados por meio de ANOVA (análise de variância) utilizando os programas *GraphPad5* e *OriginPro8*, seguido do Teste de *Tukey* para comparar os diferentes grupos. Foram considerados como significativos valores inferiores a 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

## **4.2 Biologia Molecular**

### **4.2.1 Extração de RNA e síntese de cDNA**

Foi realizada a extração de RNA por meio do kit comercial *NucleoSpin RNAII* (*Macherey-Nagel*) de acordo com o protocolo do fabricante a partir da cultura de

macrófagos J774A1 em condições normais de cultura (DMEM suplementado com 10% de SFB e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>) e de culturas realizadas em garrafas previamente recobertas por 10µg/mL de laminina (*Sigma - Aldrich*) diluídos em PBS estéril por 6 e 24hs. E também, de culturas realizadas sobre laminina com adição de 100nM do peptídeo cíclico A9a por 6 e 24hs.

O cDNA foi amplificado a partir do *pool* de RNA extraído para cada condição utilizando *Revert-Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific)* de acordo com o protocolo do fabricante.

As amostras de cDNA foram avaliados quanto a concentração e pureza por meio de absorvância utilizando *Picodrop spectrophotometer (Picodrop)* a 260/280nm e 260/230nm.

#### 4.2.2 Desenho de *primers* específicos

Utilizando o programa *ClustalW2 Multiple Sequence Alignment* foram realizados alinhamentos das sequências genéticas de camundongos das subunidades integrinas α6, α11b, α5 e β1, β3 obtidas no *GeneBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)* a fim de verificar a posição ideal de ligação para o *primer* a ser desenhado.

Por meio do programa *FastPCR* e do *Primer Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)* foram realizados desenhos de *primers* específicos para as subunidades de integrinas α6, α11b, α5 e β1, β3 (Tabela 1), observando as características ideais da temperatura de anelamento, tamanho, quantidade dos nucleotídeos guanina e citosina, possível formação de dímeros e sequência final.

#### 4.2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) *Hot Start* e *Touchdown*

Utilizando pares de *primers* específicos (Tabela 3) foi realizado PCR do tipo *Hot Start* e *Touchdown* (Tabela 4) sendo que, para um volume de 20µL de cada reação, foram adicionados 0,8µL de MgCl, 100ng ou 50ng de cDNA de células provenientes de condições normais de cultura, 10µL de mix para PCR, 6,2µL de água ultrapura, 10µM de *primer forward* e 10µM de *primer reverse* (Tabela 3).

Para a preparação do gel de agarose, foram aquecidos 2g de agarose (*Sigma*) em tampão TAE 1X (Tris-acetato 0,04M e EDTA 1mM) até a completa dissolução. Logo, adicionados 20µL do volume do amplificado, sendo para cada 6µL de amostras serão adicionados 1µL de *Orange Loading Dye Solution (Fermentas)* como tampão de amostra. Ainda, foi agregado 1µL de *Gel Red Nucleic Acid Stain 10.000x (Biotium)* na

proporção 1:200 para cada 5µL de amostra, a fim de tornar desnecessário o uso de brometo de etídeo. Para comprovar o peso das bandas obtidas, foi utilizado um marcador padrão de peso molecular de 100 a 10000 pares de bases (*Invitrogen*).

A corrida eletroforética foi realizada à 70V durante 0,5 horas. Em seguida, visualizados em luz UV (*L Pix Molecular Imaging – Loccus Biotecnologia*). Posteriormente, as bandas obtidas foram avaliadas por análise densitométrica por meio do programa *GelAnalyzer*.

**Tabela 3:** Primers desenhados para amplificação das subunidades de integrinas α6, α11b, α5, β1 e β3.

Subunidade de integrina	Sentido (5' – 3')	Primer	Tamanho (bp)	Tm (°C)	%CG
α6	Forward	AGGACAACGTGATCCGAAATCGG	24	59.07	54.17
		GCTGAGCACAGCTTTCAACCTGGA	24	59.65	54.17
	Reverse	GAAGAAGCCAGGCC TTCACCATCA	24	58.93	54.17
		CCCCTGTGATTGGCTCTTGAG	24	59.23	58.33
α5	Forward	CCCTCTTTGGCTTCTCCGTGGAGTT	25	60.40	56.00
		ACGGAGTCAGTGTGCTGGTTGG	22	59.03	59.09
	Reverse	GAGGCCATCTGTTCTCCTGAGACG	24	58.60	58.33
		ACCCTCTGGGTGCTGCAGATAGAT	24	58.96	54.17
α11b	Forward	CACTGTTCTCTGGGACCAAGTGCTG	24	59.65	58.33
		CTGGGCCTTGAACCTGGACTCTGT	24	60.12	58.33
	Reverse	ATCTGCTCTCCATGAAGCCTGTGC	24	59.06	54.17
		CCTGTGCAGGGTCTGGTAGTAGGA	24	58.92	58.33
β3	Forward	AGATCCTGGAAGCTCTTCCGCTCA	24	59.22	54.17
		ATTGAGTTCCAGTCAGCGAGGC	23	58.95	56.52
	Reverse	TCCCCGGGATGAGCTACTGTAAT	24	58.97	54.17
		CCCATCATTGGGCAAGACAATGC	23	58.82	54.17
β1	Forward	AGCAAAGGGATGGCAGAGAAGCTC	24	59.46	54.17
		GCTCCGGCCAGAAGACATTACTCA	24	58.53	54.17
	Reverse	TCCAGGTGACTGCGCCATATTG	24	59.58	54.17
		GTGCCACTGCTGACTTAGGAATCA	25	58.75	52.00

**Tabela 4:** Condições de amplificação aplicadas para o PCR do tipo *Hot Start* e *Touchdown*.

Etapa	Temperatura (°C)	Duração (min)	Número de ciclos	Varição de temperatura (Δ)
Desnaturação inicial	94°C	3min	-	-
Desnaturação	94°C	1min	15 ciclos	-
Anelamento	70°C a 55°C	1min		-1,0°C
Extensão	72°C	1min		-
Desnaturação	94°C	1min	30 ciclos	-
Anelamento	55°C	1min		-
Extensão	72°C	1min		-
Extensão final	72°C	10min	-	-

#### 4.2.4 Seleção e validação de genes de referência para qPCR

Para acurácia do PCR real time quantitativo (qPCR), o qual gera fluorescência proporcional a quantidade de produto amplificado ao longo das diferentes fases, é necessário que ocorra normalização dos dados obtidos pela amplificação. Logo, são utilizados genes de referência, os quais devem passar por avaliação para validá-los uma vez que a expressão destes também pode variar (Jacob *et al.*, 2013; Gimeno *et al.*, 2014).

Para isso, as sequências de *primers* para os genes de referência *ACTB*, *GAPDH*, *PGK1*, *B2M*, *GUSB*, *HPRT1*, *PPIA* e *RPL13A* (Tabela 5) foram obtidas da *GenOne* ([www.genone.com.br](http://www.genone.com.br)) (Tabela 7).

Foram utilizadas placas de 96 poços (*MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode 0,1mL - Applied Biosystems*) para aplicar as reações e estas placas foram posteriormente seladas com adesivos óticos (*MicroAmp Optical Adhesive Film - Applied Biosystems*) a fim de proteger o conteúdo de cada reação de qPCR da evaporação e contaminação durante a ciclagem. Os experimentos foram realizados em triplicata, com triplicatas técnicas em cada etapa, totalizando n=9.

As reações de qPCR foram realizadas no equipamento *StepOne Plus cycler* (*Applied Biosystems*) sob as condições de ciclagem propostas pelo fabricante dos *primers* (Tabela 6). Cada reação de qPCR consistiu em 1 $\mu$ M de primer *forward* e *reverse* (*GenOne*), 50ng de cDNA (cDNA de macrófagos da linhagem J774A1 sob condições normais de cultura e incubadas com 100nM do peptídeo cíclico A9a por 6 e 24hs), 6,25 $\mu$ L de Mix contendo *Sybr Green* (*Thermo Scientific*), 100nM de ROX (*Thermo Scientific*) e 3,7 $\mu$ L de água ultrapura a fim de completar o volume de reação de 12 $\mu$ L.

A amplificação dos produtos foi seguida pela análise de *melting curve* para checar a especificidade da amplificação dos produtos e a ausência da formação de dímeros de *primer* e possível contaminação. A integridade dos produtos amplificados também foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 2% e expostos a luz UV (*L Pix Molecular Imaging - Locus Biotechnology*).

Os dados da fluorescência foram exportados para o algoritmo *BestKeeper* (Pfaffl *et al.*, 2004) para calcular a média dos valores obtidos nos ciclos (*threshold*), o desvio padrão, o coeficiente de Pearson (r) e o coeficiente de variância entre as amostras baseados nos *crossing points* a fim de eliminar os genes de referência candidatos que apresentarem grandes desvios padrão. Os dados também foram analisados pelos

valores obtidos de  $\Delta\Delta Ct$  utilizando o programa *StepOne v2.1 (Applied Biosystems)* tendo a quantificação relativa estimada pela Equação 1 (Livak; Schmittgen, 2001), a fim de avaliar a repetitividade de expressão e, as diferenças estatísticas na eficiência da amplificação (média $\pm$ desvio padrão) foram verificadas por meio do programa *GraphPad Prism5* por meio de *two-way ANOVA* seguido de teste de Bonferroni para comparar os diferentes grupos. Foram considerados como significativos valores inferiores a 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

Para avaliar a expressão de modo comparativo entre as diferentes condições experimentais também foram utilizados os algoritmos *NormFinder (Andersen et al., 2004)*, o qual calcula valores de estabilidade para os genes de referência candidatos para a normalização, e *geNorm (Vandesompele et al., 2002)*, o qual converte os valores obtidos pela amplificação em quantidades relativas para fornecer o valor de estabilidade M.

**Tabela 5:** Genes de referência candidatos no presente estudo.

Gene	Símbolo	Função do gene	ID
Actin beta	<i>ACTB</i>	Cytoskeletal structural actin	11461
Beta-2-microglobulin	<i>B2M</i>	Component of the MHC class 1 molecules	12010
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>GAPDH</i>	Enzyme in glycolysis and nuclear functions	14433
Glucuronidase beta	<i>GUSB</i>	Hydrolase that degrades glycosaminoglycans	110006
Hypoxanthine phosphoribosyltransferase-1	<i>HPRT1</i>	Generation of purine nucleotides	15452
Phosphoglycerate kinase 1	<i>PGK1</i>	Glycolytic enzyme	18655
Peptidylprolyl isomerase A	<i>PPIA</i>	Accelerate the folding of proteins	268373
Ribosomal protein L13a	<i>RPL13A</i>	Structural component of the 60S ribosomal subunit	22121

#### 4.2.5 Realização de qPCR utilizando *Integrin signaling array*

Após a identificação dos genes de referência adequados, ou seja, que estão presentes em todas as condições celulares, com grande número de cópias e ainda apresentam maior estabilidade entre as condições experimentais, foram selecionados *primers* específicos de sinalização de integrinas (Tabela 7) provenientes do kit comercial *Integrin signaling array (GenOne)*.

Os experimentos de qPCR *Comparative  $\Delta Ct$*  foram realizados no equipamento *StepOne Plus (Applied Biosystems)*, utilizando placas de 96 poços (*MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode 0,1mL - Applied Biosystems*) as quais foram seladas com adesivos óticos (*MicroAmp Optical Adhesive Film - Applied Biosystems*) após montada a reação.

Cada reação de qPCR consistiu em 1µM de primer *forward* e *reverse* (*Integrin signaling array - GenOne*), 50ng de cDNA (cDNA de macrófagos da linhagem J774A1 sob condições normais de cultura e incubadas com 100nM do peptídeo cíclico A9a por 6 e 24hs), 6,25µL de Mix contendo *Sybr Green* (*Thermo Scientific*), 100nM de ROX (*Thermo Scientific*) e 3,7µL de água ultrapura a fim de completar o volume de reação de 12µL. Então, foram submetidas às condições de ciclagem de acordo com o fabricante (Tabela 6).

A análise dos resultados do qPCR foi realizada por meio da observação dos valores obtidos de  $\Delta\Delta C_t$  utilizando o programa *StepOne v2.1* (*Applied Biosystems*), tendo a quantificação relativa estimada pela Equação 1 (Livak; Schmittgen, 2001) após a expressão das subunidades de integrinas (média±desvio padrão) serem comparadas com um gene normalizador estabelecido (Equação 2). Seguido, foram realizadas análises estatísticas no programa *GraphPad Prism5* e planilha customizada no programa *Microsoft Excel*.

$$RQ=2^{-\Delta\Delta C_T}$$

**Equação 1:** Equação utilizada para converter os valores obtidos de  $\Delta\Delta C_t$  em quantidades relativas (*Relative quantification* = RQ) a fim de elevar a eficiência da reação e facilitar a observação dos dados quando comparadas ao gene de referência (RQ=1). O desvio padrão é estabelecido pelo erro padrão do  $\Delta C_t$ , em intervalo de confiança de 95%. Adaptado de *User Bulletin #2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System*; Livak e Schmittgen (2001).

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta\Delta C_T}$$

**Equação 2:** Expressão final das diversas fórmulas aritméticas utilizadas para medir a quantidade do gene alvo em relação a um gene normalizador de acordo com a amplificação exponencial promovida pelo qPCR até atingir um limiar fixo, considerando mesma a eficiência do alvo e do normalizador.  $X_{N,q}$ = quantidade normalizada média do gene alvo na amostra;  $X_{N,cb}$ = quantidade normalizada média do gene referência; K=constante; E= eficiência na amplificação do gene alvo e do gene referência;  $\Delta C_{t,q}$ = diferença nos ciclos limiares na amplificação do gene alvo;  $\Delta C_{t,cb}$ = diferença nos ciclos limiares para o gene referência;  $\Delta\Delta C_t$ = a quantidade de alvo normalizados para uma referência endógena e em relação a um padrão. Adaptado de *User Bulletin #2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System*.



**Tabela 6:** Condições de amplificação do qPCR de acordo com o protocolo do fabricante.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Duração (min)</b>	<b>Número de ciclos</b>
Desnaturação inicial	95°C	10min	-
Desnaturação	95°C	10seg	45 ciclos
Anelamento/Extensão	58°C	45seg	

**Tabela 7:** Genes selecionados do kit *Integrin Signaling Array* para o estudo utilizando qPCR.

<b>Grupo</b>	<b>Genes</b>
Constitutivos	<i>ACTB</i>
	<i>GAPDH</i>
	<i>PGK1</i>
	<i>B2M</i>
	<i>GUSB</i>
	<i>HPRT1</i>
	<i>PPIA</i>
	<i>RPL13A</i>
Integrinas	<i>ITGA4</i>
	<i>ITGA5</i>
	<i>ITGA6</i>
	<i>ITGAV</i>
	<i>ITGB1</i>
	<i>ITGB3</i>

## 5 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram separados em dois grupos: 5.1 Biologia Celular e 5.2 Biologia Molecular.

### 5.1 Resultados obtidos em Biologia Celular

#### 5.1.1 Diminuição da adesão celular em laminina com preservação da viabilidade celular

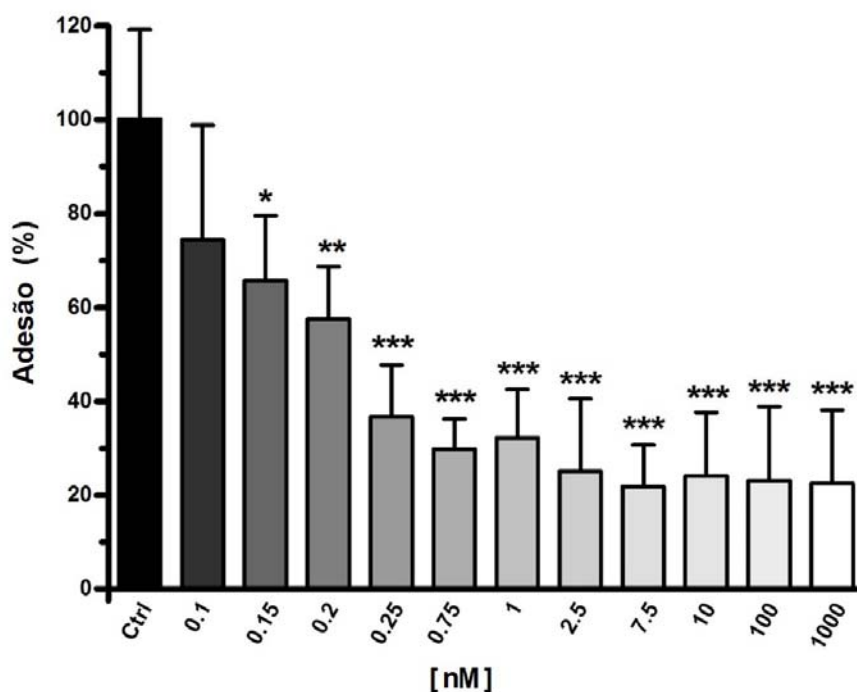
Aqui foi investigado se o peptídeo cíclico A9a poderia reduzir a adesão celular e qual a concentração ideal. Para isso, foi adicionado 0,1nM, 0,25nM, 0,75nM, 1nM, 10nM, 25nM, 75nM, 100nM e 1000nM de A9a nos poços incubados com laminina previamente.

Foi observado que em mínimas concentrações de A9a (0,1nM) já ocorre modulação negativa dos macrófagos (26%). Sob a concentração de 0,15nM e 0,20nM de A9a foi observada redução estatisticamente significativa de 34% e 43% da adesão celular respectivamente. Enquanto as concentrações 0,25nM, 0,75µM, 1nM, 2,5nM, 7,5nM, 10nM, 100nM e 1000nM proporcionaram 63% a 78% de redução estatisticamente significativa da adesão celular (Figura 8), no qual o maior valor de redução celular foi atingido pela concentração de 7,5nM de A9a (Figura 8).

Para verificar o quanto efetivo esse peptídeo é, foi também verificado o IC<sub>50</sub> que indica a quantidade do peptídeo em particular que é necessário para inibir o processo de adesão celular em 50%. Essa observação é feita comumente para avaliar o potencial de um determinado fármaco. E, para A9a o IC<sub>50</sub> foi obtido satisfatoriamente em concentrações mínimas, sendo observado entre 0,20nM e 0,25nM do peptídeo cíclico A9a (Figura 9).

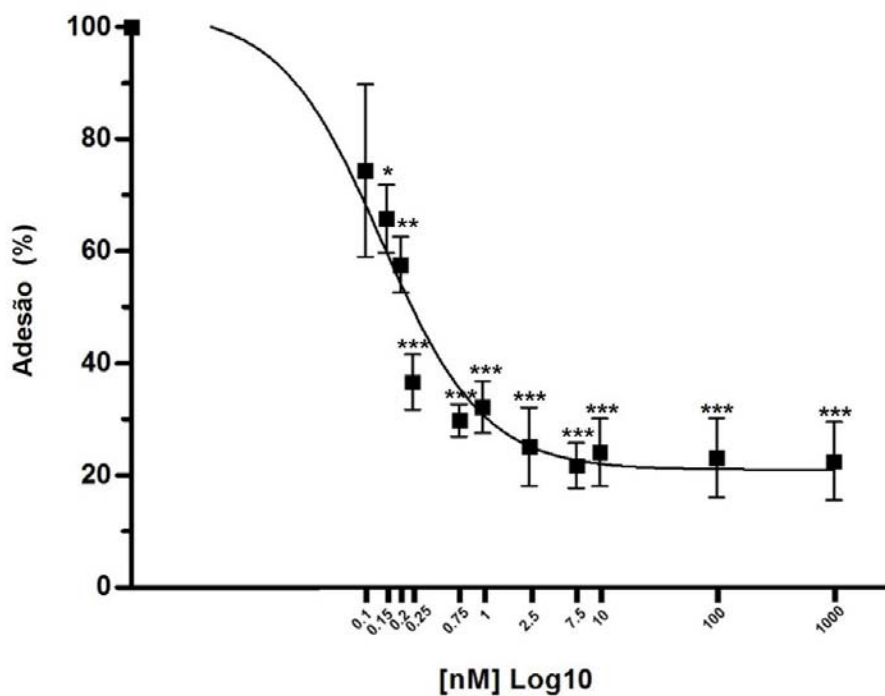
Como pode ser observado na Figura 10, o ensaio colorimétrico de MTT demonstrou que o peptídeo cíclico A9a não possui efeito citotóxico. Utilizando A9a nas concentrações 0,1nM, 1nM, 10nM, 100nM, 1000nM, 10000nM foi possível observar a formação de cristais de formazan sem diferenças estatísticas entre o controle (0,521±0,02) e as concentrações de A9a (0,405±0,02; 0,394±0,01; 0,381±0,02; 0,414±0,04; 0,387±0,02; 0,485±0,01 respectivamente).

### Adesão dos macrófagos em laminina com A9a

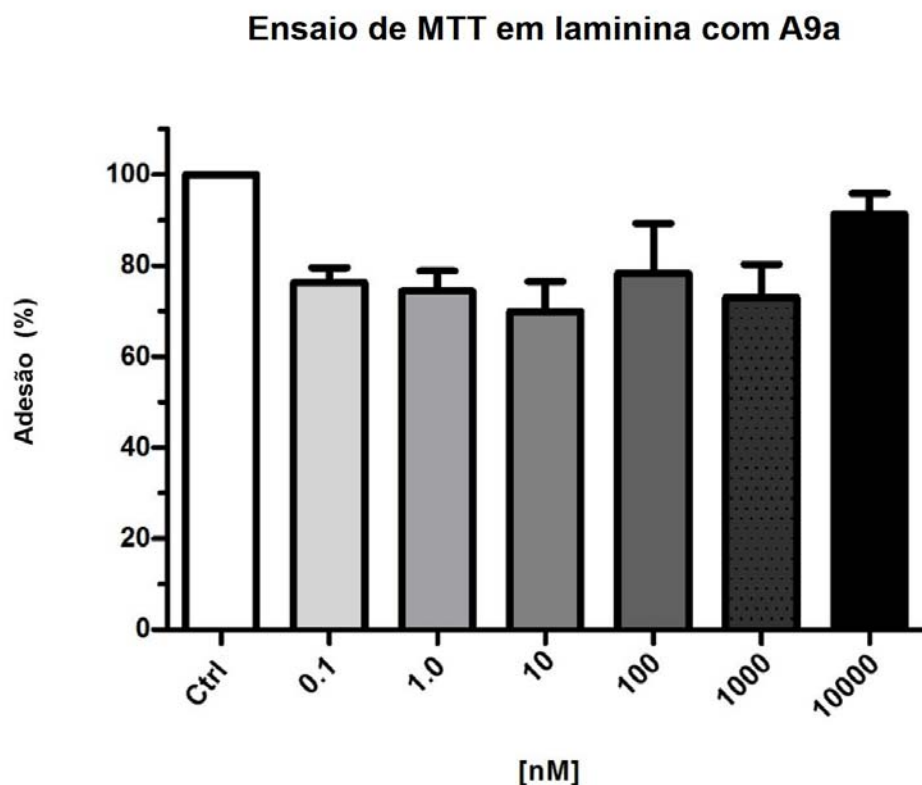


**Figura 8:** Porcentagem de adesão celular obtida a partir de testes de adesão celular com culturas de macrófagos da linhagem J774A1 em poços incubados com laminina e diferentes concentrações adicionadas do peptídeo cíclico A9a. As barras representam o desvio padrão e asteriscos (\*) mostram a significância estatística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n=6$ ).

### Adesão celular em laminina ( $IC_{50}$ )



**Figura 9:** Gráfico com demonstração do *slope* para visualização dos valores sugeridos para  $IC_{50}$  a partir de regressão não linear obtida pelo *GraphPad Prism5*. O valor de  $IC_{50}$  para A9a pode ser observado entre 0,2nm e 2,5nm. As barras representam o desvio padrão e asteriscos (\*) mostram a significância estatística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n=6$ ).



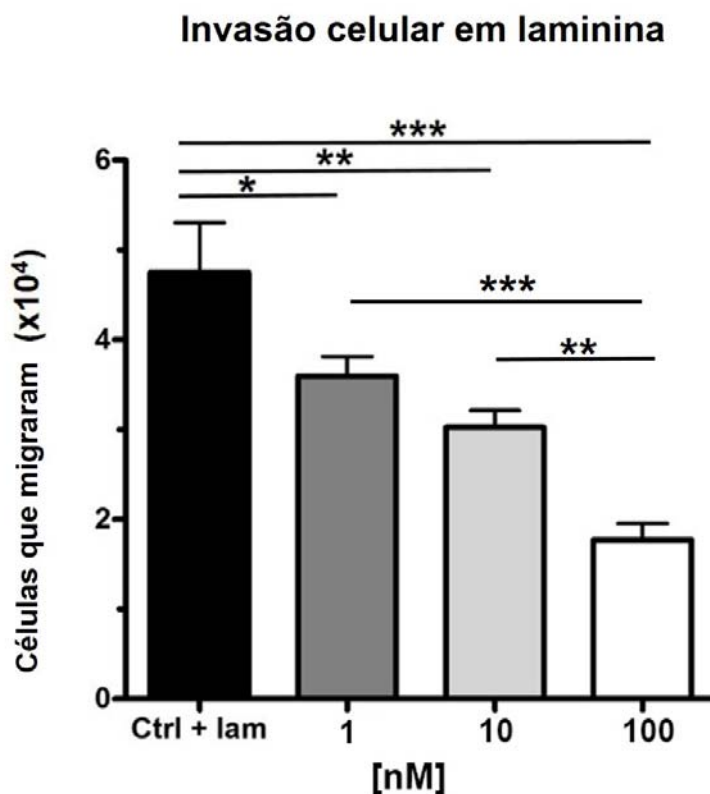
**Figura 10:** Resultado de ensaio de MTT realizado de acordo com Mosmann (1983) ajustado para 48hs. Em todas as concentrações de A9a utilizadas foi observada viabilidade celular pela formação de cristais de formazan e ausência de diferenças estatísticas quando os valores foram comparados ao controle. As barras representam o desvio padrão (n=6).

### 5.1.2 A9a diminui a migração celular *in vitro* - *transwell* - em laminina

O ensaio de invasão celular *in vitro* em *transwell* é comumente utilizado para avaliar a capacidade migratória da célula frente a um composto.

Logo, como mostra a Figura 11, nas membranas tipo *transwell* que receberam a adição do peptídeo A9a nas concentrações 1nM, 10nM e 100nM foi observado diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) da migração celular em laminina quando comparados ao controle. Ou seja, de  $2,5 \times 10^5$  células de macrófagos da linhagem J774A1 adicionadas inicialmente,  $4,8 \times 10^4$  células migraram no controle. Entretanto, quando utilizada a concentração de 1nM de A9a,  $3,6 \times 10^4$  células migraram, ou seja 25% a menos do que foi observado no controle.

Com adição de 10nM,  $3,0 \times 10^4$  células migraram, ou seja, 37,5% a menos que o controle e, notoriamente, quando adicionado 100nM de A9a, apenas  $1,8 \times 10^4$  células migraram caracterizando uma diminuição da migração em 62,5%. Esse fato é coerente com os resultados obtidos no teste de adesão celular utilizando laminina como ECM e A9a, uma vez que, se a célula diminui a adesão celular em laminina, conseqüentemente, o evento de migração em laminina também estará reduzido, já que um evento depende do outro (Schenkel *et al.*, 2004).



**Figura 11:** Número de células que migraram através das membranas incubadas com laminina frente a diferentes concentrações de peptídeo cíclico A9a. As barras representam o desvio padrão e asteriscos (\*) mostram a significância estatística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n=3$ ).

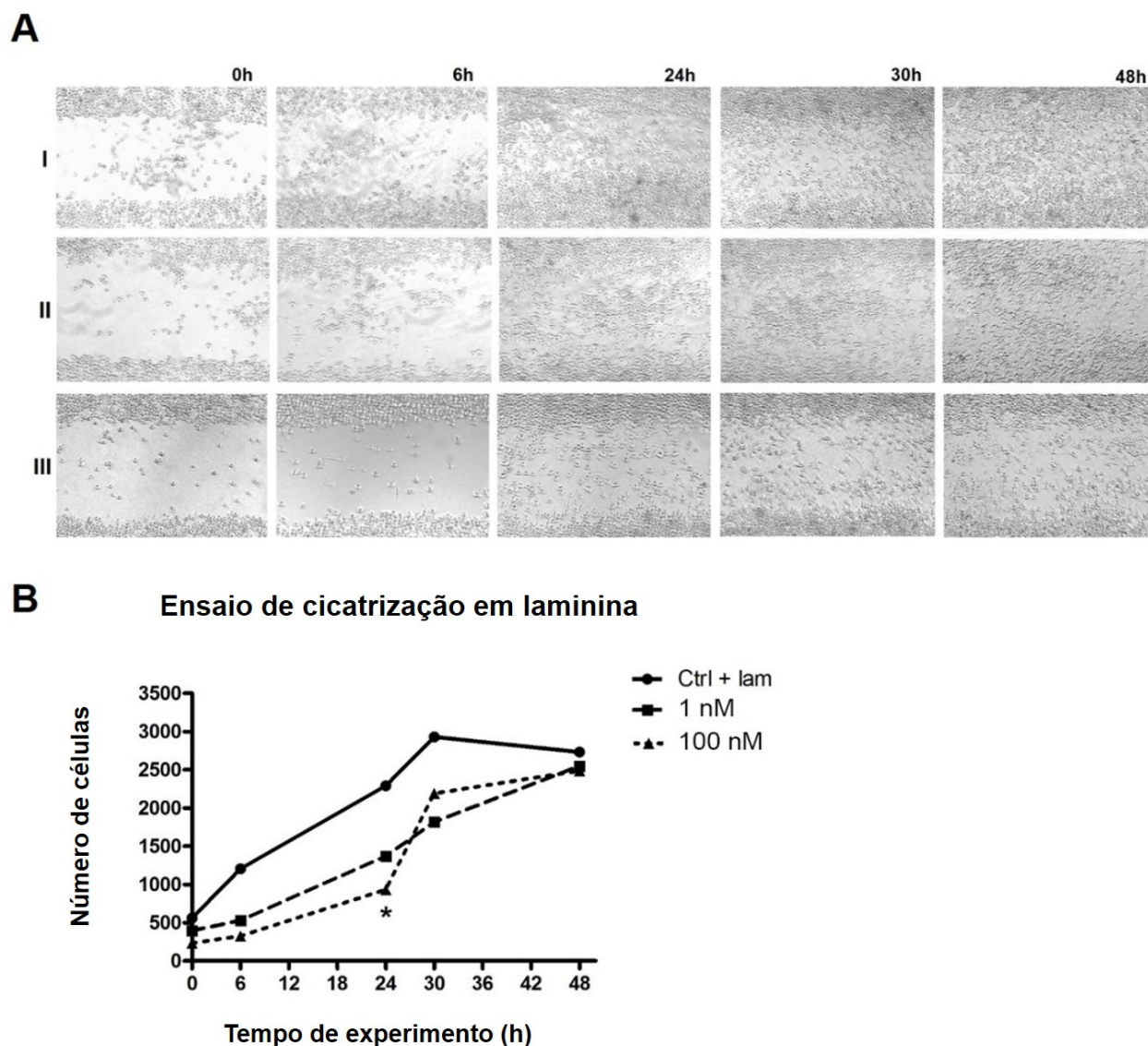
### 5.1.3 Modulação negativa da adesão, migração e proliferação celular

Os ensaios biológicos de cicatrização envolvem processos de adesão, migração e proliferação celular durante o fechamento da monocamada lesada.

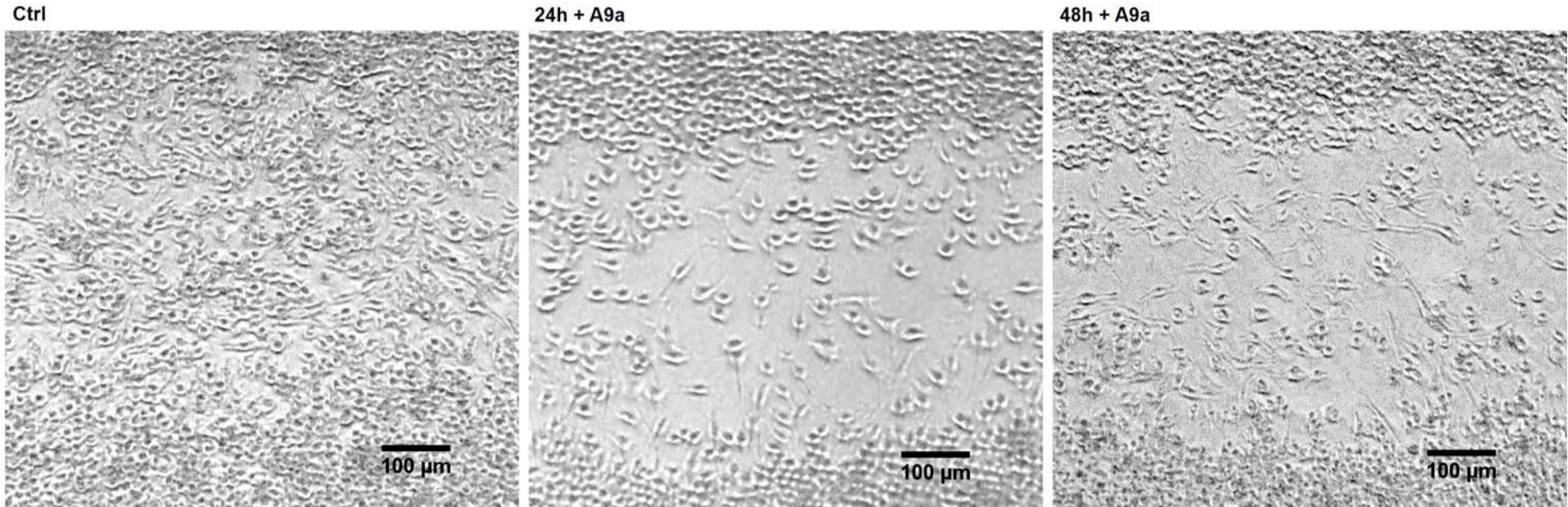
Nos poços incubados com laminina, foram adicionadas as concentrações 1nM e 100nM de A9a. Contudo, foi observado menor fechamento da lesão apenas na concentração 100nM do peptídeo A9a no tempo de 24hs quando comparado ao controle (Figura 12) onde foram observados valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ), o que sugere uma inativação dos processos de adesão e migração celular neste período, proporcionando um retardo do fechamento da lesão. Em nenhum outro tempo de experimento (0, 6, 24, 30 e 48hs) foram verificados valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

Desse modo, esse retardo do fechamento da lesão quando adicionado 100nM do peptídeo A9a condiz com o observado nos experimentos anteriores de adesão celular e ensaios com *transwell*, onde foi observado que há diminuição da adesão e da movimentação/migração celular, respectivamente. E, cabe salientar que, as células estavam viáveis e sem alterações morfológicas aparentes (Figura 13) durante todo o

tempo de experimento (de 0 a 48hs) e principalmente ao final do experimento (48hs), onde há o fechamento da lesão, como pode ser acompanhado pela Figura 12, formando uma monocamada, do mesmo modo que ocorreu no controle e em condições normais previamente observadas da cultura celular de J774A1.



**Figura 12:** **A** - Imagens obtidas a partir de fotografias por microscopia de contraste (obj.10x) dos diferentes tempos de análise do teste de cicatrização (0, 6, 24, 30 e 48h). **I** – Ensaio de cicatrização realizado em poços incubados com laminina sem a adição de qualquer peptídeo cíclico. **II** - Ensaio de cicatrização realizado em poços incubados com laminina que receberam adição de 1nM de peptídeo cíclico A9a. **III** - Ensaio de cicatrização realizado em poços incubados com laminina que receberam adição de 100nM de peptídeo cíclico A9a. **B** - Análise do fechamento das lesões realizadas nas culturas celulares dispostas para adesão em laminina, durante o ensaio de cicatrização celular nos intervalos de tempo 0, 6, 24, 30 e 48h, frente a diferentes concentrações de peptídeo cíclico. O asterisco (\*) mostra a significância estatística (\* $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ).



**Figura 13:** Imagens obtidas a partir de fotografias por microscopia de contraste (obj.10x) para demonstrar a ausência de alterações morfológicas aparentes nas células J774A1 de poços incubados com laminina sem a adição de peptídeo cíclico A9a (Ctrl), de poços incubados com laminina que receberam adição de 100nM de peptídeo cíclico A9a por 24h (24h + A9a) e, de poços incubados com laminina que receberam adição de 100nM de peptídeo cíclico A9a por 48h (48h + A9a) (n=6).

## 5.2 Resultados obtidos em Biologia Molecular

### 5.2.1 Qualidade e integridade das amostras de cDNA

Nesta etapa do estudo foi avaliada a qualidade e integridade do cDNA obtido a partir da cultura de macrófagos J774A1 em condições normais de cultura (DMEM suplementado com 10% de SFB e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>) e de culturas realizadas em garrafas previamente recobertas por 10µg/mL de laminina (*Sigma - Aldrich*) diluídos em PBS estéril com ou sem adição de 100nM do peptídeo cíclico A9a por 6 e 24hs.

A razão da absorvância a 260/280nm foi utilizada para verificar a pureza do cDNA e a razão 260/230nm para sugerir a presença de contaminantes. A média das razões da absorvância (média±desvio padrão) em cDNA obtido de condições normais de cultura foi 1,870±0,04 (260/280nm) e 1,896±0,02 (260/230nm). Para o cDNA obtido de macrófagos cultivados sobre laminina por 6hs e por 24hs foi 1,895±0,02 e 1,892±0,03 (260/280nm) e 1,885±0,02 e 1,892±0,04 (260/230nm) respectivamente. As médias das razões de absorvância em culturas tratadas com A9a por 6 e 24hs foram 1,845±0,02 e 1,832±0,03 (260/280nm) e 1,939±0,01 e 1,967±0,04 (260/230nm) respectivamente. Esses resultados sugerem que as amostras de cDNA obtidas preenchem criteriosamente os requisitos de pureza e integridade para os demais experimentos propostos.

### 5.2.2 Análise dos produtos do PCR *Hot Start/Touchdown*

Como primeira etapa para avaliação das subunidades de integrinas presentes na linhagem de macrófagos de camundongo J774A1, foram realizados PCR *Hot Start/Touchdown* com duas concentrações diferentes de cDNA proveniente de culturas em condições normais (Tabela 8) utilizando *primers* desenhados especificamente para as subunidades β1, α5, α6, α11b e β3.

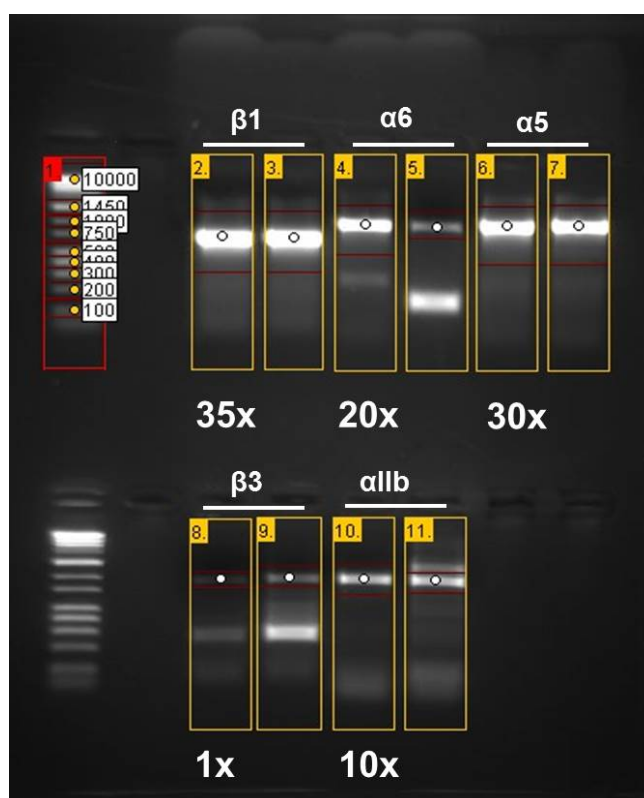
Após eletroforese em gel de agarose 2% e exposição em luz UV, os produtos obtidos foram inseridos no programa *GelAnalyzer* para uma análise semi quantitativa (Figura 14). O programa demonstrou que as bandas foram do tamanho esperado, ou seja, entre 600 a 900 pares de bases (Tabela 8) e cada banda com a mesma quantidade de cDNA foi comparada. Foram observadas maiores quantidades de β1 e α5, seguido de α6, quando comparado a α11b e β3, correspondendo a 35, 30, 20 e 10 vezes mais do que apresentado por β3, respectivamente. Sugerindo assim, expressão



substancial de  $\alpha 5\beta 1$  e quantidade ainda elevada de  $\alpha 6\beta 1$ , enquanto  $\alpha 11\beta 3$  é expressa em menor quantidade (Figura 15).

**Tabela 8:** Dados obtidos a partir da análise densitométrica utilizando o programa *GelAnalyzer*.

Subunidade de integrina	Concentração (ng/ $\mu$ L)	Rf	Tamanho do fragmento (pb)	Área
$\alpha 6$	244,1	0,121	949	2005
	122,0	0,126	886	449
$\alpha 5$	244,1	0,124	910	2480
	122,0	0,124	910	2478
$\alpha 11\beta$	244,1	0,279	875	922
	488,2	0,285	910	658
$\beta 3$	244,1	0,327	640	92
	488,2	0,281	656	273
$\beta 1$	244,1	0,141	720	2988
	122,0	0,144	690	3103



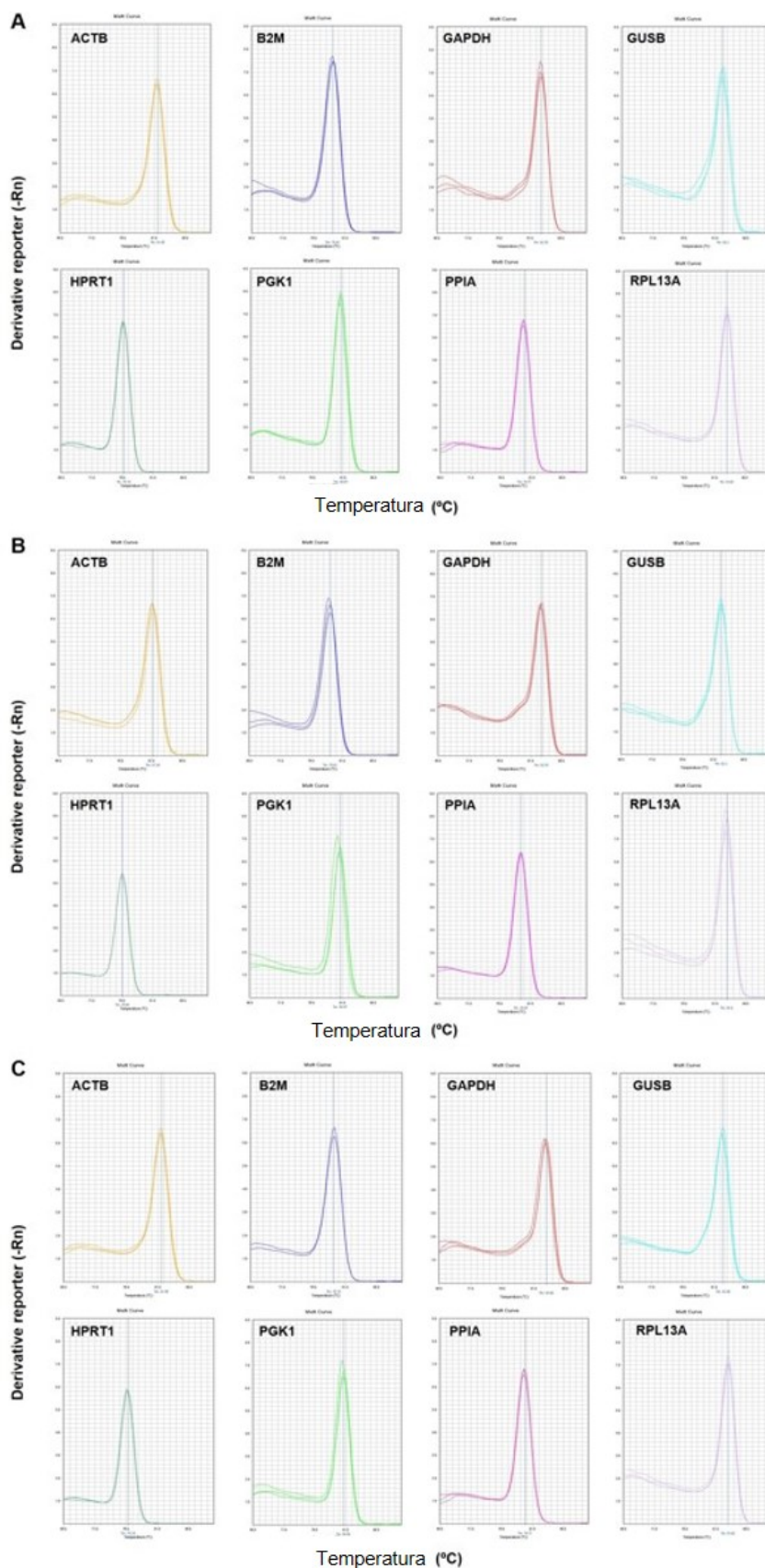
**Figura 14:** Comparação semi quantitativa dos produtos do PCR *Hot Start/Touchdown*, apresentando as proporções de expressão das subunidades de integrina  $\beta 1$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 5$  e  $\alpha 11\beta$  quando comparado a expressão da subunidade  $\beta 3$ .

### 5.2.3 Especificidade da amplificação dos produtos por qPCR

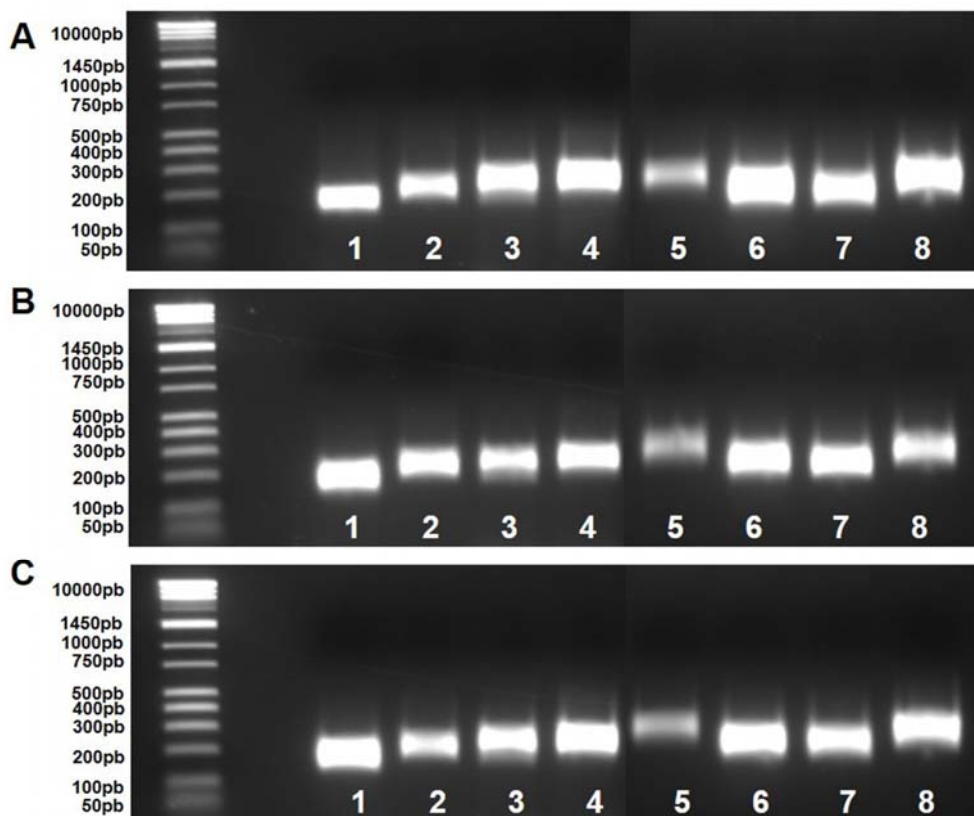
A reação em cadeia de polimerização em tempo real combina a metodologia de PCR convencional com um mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência. A metodologia permite que os processos de amplificação, detecção e quantificação de

DNA sejam realizados em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados e diminuindo o risco de contaminação da amostra e dando maior precisão (Saunders, 2004). Então, para realizar o experimento de qPCR, além de avaliar a qualidade e integridade do cDNA obtido, é necessário verificar a especificidade de cada *primer* utilizado. Para isso, foram observados *plots* de amplificação e mais criteriosamente, cada *melting curve* de 8 genes de referência candidatos (Tabela 5) em cDNA proveniente de grupo controle (Ctrl) e de grupo com células cultivadas sobre laminina por 6hs (6h+lam) e 24hs (24hs+lam).

Cada gene apresentou individualmente um *plot* para o *melting curve*, demonstrando um único pico, o que sugere a especificidade do *primer* e a ausência de contaminação dos *primers* ou do cDNA (Figura 15). Ainda, os produtos do qPCR visualizados em gel de agarose 2% mostraram a amplificação de uma única banda de tamanho esperado para cada gene testado nesta etapa (Figura 16), indicando que o material estava apto para a uso nos experimentos de qPCR, uma vez que é possível realizar a correta quantificação e/ou não obter interferência na expressão gênica.



**Figura 15:** *Melting curves* obtidas pelo programa *StepOne v2.1* (*Applied Biosystems*) de 8 genes de referência candidatos, demonstrando um único pico de amplificação. Cada experimento foi realizado com  $n=9$ . **A** - *Melting curve* de qPCR realizado com cDNA obtido de culturas de células sob condições normais (Ctrl). **B** - *Melting curve* de qPCR realizado com cDNA obtido de células cultivadas sobre laminina por 6hs (6h+lam). **C** - *Melting curve* de qPCR realizado com cDNA obtido de células cultivadas sobre laminina por 24hs (24h+lam).



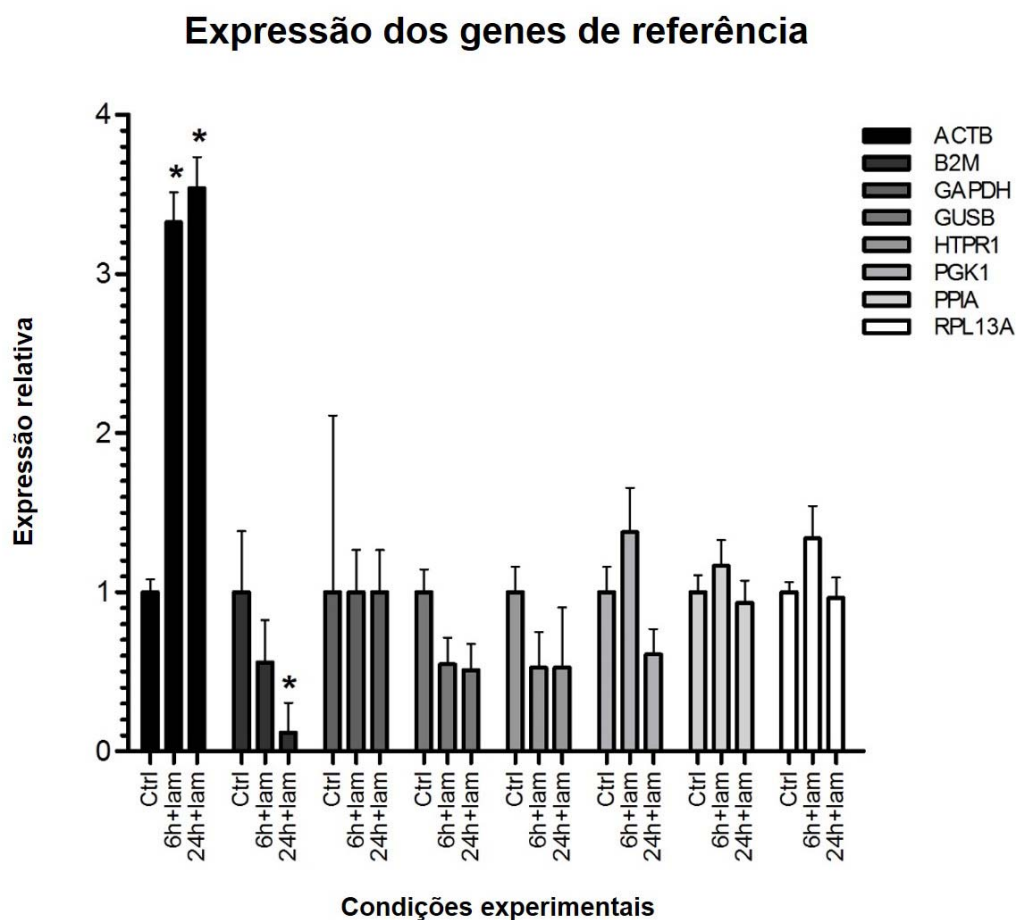
**Figura 16:** Produtos da eletroforese em gel de agarose 2% visualizados em luz UV, com tamanho esperado para cada gene estudado nesta etapa. **A** - *Melting curve* de qPCR realizado com cDNA obtido de culturas de células sob condições normais. **B** - *Melting curve* de qPCR realizado com cDNA obtido de células cultivadas sobre laminina por 6hs. **C** - *Melting curve* de qPCR realizado com cDNA obtido de células cultivadas sobre laminina por 24hs. Números representam 1= *ACTB*, 2= *B2M*, 3= *GAPDH*, 4= *GUSB*, 5= *HTPR1*, 6= *PGK1*, 7= *PPIA*, 8= *RPL13A*.

#### 5.2.4 Padrão de expressão dos genes de referência nas células J774A1 em laminina

Para checar o padrão de expressão dos genes de referência candidatos *ACTB*, *GAPDH*, *PGK1*, *B2M*, *GUSB*, *HPRT1*, *PPIA* e *RPL13A* (Tabela 5) foram avaliados os valores obtidos de  $\Delta\Delta Ct$  fornecido pelo programa *StepOne v2.1*. Logo, os valores observados de  $\Delta\Delta Ct$  para o grupo controle (Ctrl) como para o grupo tratado com A9a com células cultivadas sobre laminina por 6hs (6h+lam) e 24hs (24h+lam), foram de 0,51 a 1,37.

Valores dissonantes foram observados para os genes *B2M*, que apresentou  $\Delta\Delta Ct$  de 0,12 para a condição de células cultivadas sobre laminina por 24hs, ou seja, muito inferior que o observado nos demais genes. Já, valores dissonantes estatisticamente maiores foram observados para o gene *ACTB* com  $\Delta\Delta Ct$  de 3,32 nas condições de células cultivadas sobre laminina por 6 e 24hs (Figura 17). Isso sugere que os genes de referência *B2M* e *ACTB* não são indicados como normalizadores do

qPCR em macrófagos. Logo, os genes *GAPDH*, *PPIA* e *RPL13A* foram abundantes e exibiram elevados níveis de expressão em todas as condições experimentais utilizadas.



**Figura 17:** Análise comparativa dos valores de  $\Delta\Delta Ct$  obtidos para os genes de referência candidatos em diferentes condições experimentais. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de 3 repetições, cada um com 3 replicatas (n=9). A quantificação relativa foi estimada pela equação  $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Ctrl representa os resultados obtidos no qPCR utilizando cDNA na condição controle, ou seja, sob condições normais de cultura. 6h+laminina representa os resultados obtidos no qPCR utilizando cDNA de células cultivadas sobre laminina por 6hs. 24h+laminina representa os resultados obtidos no qPCR utilizando cDNA de células cultivadas sobre laminina por 24hs. As barras representam o desvio padrão e asteriscos (\*) mostram a significância estatística (\*p<0,05; n=9).

### 5.2.5 Análise da estabilidade de expressão dos genes de referência em macrófagos quando associados à ECM

A identificação do gene de referência mais adequado e confiável entre várias condições de desenvolvimento e/ou experimentais contribui para a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados de qPCR (Vandesompele *et al.*, 2002; Dheda *et al.*, 2004).

Considerando que alguns genes de referência candidatos (Tabela 5) demonstraram variação na expressão quando comparados aos demais genes e condições experimentais, após verificar o padrão de expressão para cada gene de referência candidato, foi analisada a estabilidade de expressão de cada um deles sob condições normais de cultura e quando cultivadas sobre laminina. Análises adicionais foram realizadas a fim de identificar a combinação mais adequada de genes de referência para a normalização da expressão gênica em experimentos com macrófagos relacionados à ECM.

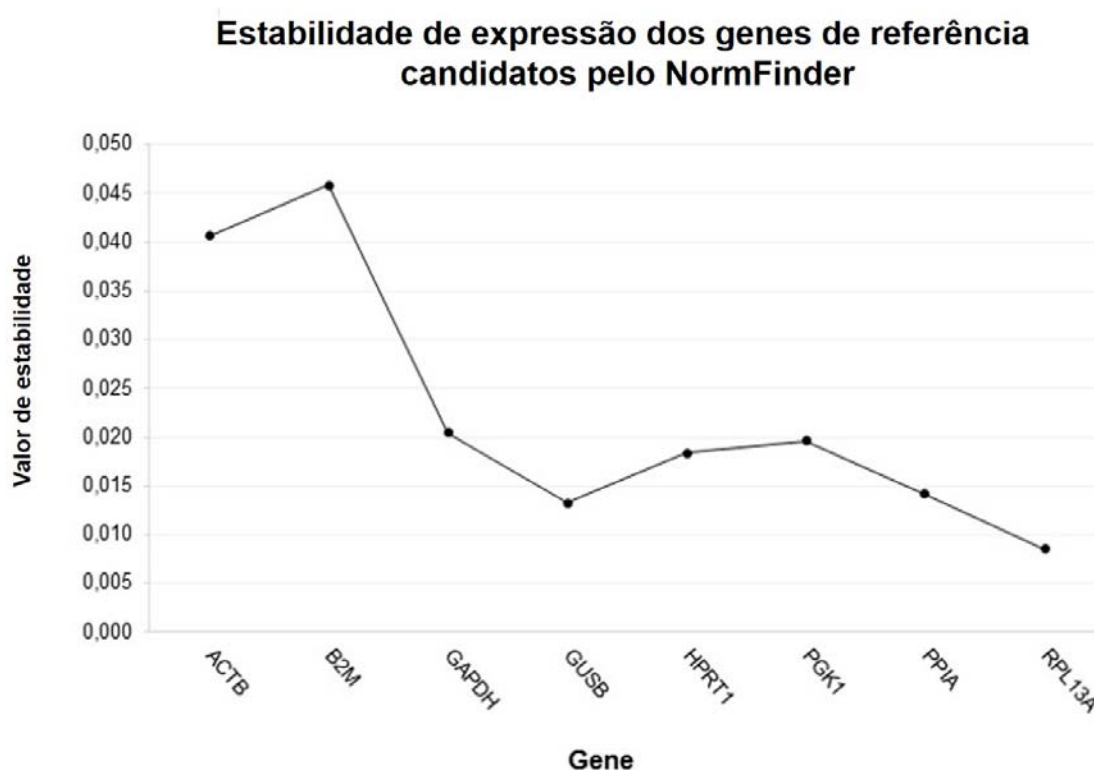
*Bestkeeper* foi utilizado para classificar a estabilidade dos genes de referência candidatos por meio de uma comparação da expressão e dos *crossings points*, mostrando melhores valores de estabilidade de acordo com a análise de correlação de Pearson, eliminando os genes com alto desvio padrão ( $SD \geq 1$  começando a variação pelo fator 2) das demais avaliações (Pfaffl *et al.*, 2004). Os genes de referência candidatos em todas as condições experimentais (Ctrl, 6h+lam e 24h+lam) mostraram coeficientes de expressão estatisticamente significativos ( $p \leq 0,001$ ). No entanto, o desvio padrão e o coeficiente de variância (<10%) de cada gene em todas as condições experimentais foi menor para *GAPDH*, *PPIA* e *RPL13A*, indicando maior estabilidade de expressão nestes genes. Estes genes de referência também mostraram forte correlação ( $0,97 < r < 0,98$ ) (Tabela 9). Resultado semelhante foi observado pela análise supracitada do  $\Delta\Delta Ct$ .

**Tabela 9:** Estatística descritiva dos genes de referência candidatos baseado no valor de *crossing point* (CP) obtida pelo programa *BestKeeper* n = número de experimentos; nt = número de réplicas técnicas e suas replicatas; GM = média geométrica; AM = média aritmética; Min = valor mínimo; Max = valor máximo; SD = desvio padrão; r = coeficiente de correlação de Pearson; CV = coeficiente de variância (%) entre as amostras (Ctrl; 6h+lam; 24h+lam); p = valor de p.

	<i>ACTB</i>	<i>B2M</i>	<i>GAPDH</i>	<i>GUSB</i>	<i>HPRT1</i>	<i>PGK1</i>	<i>PPIA</i>	<i>RPL13A</i>
<b>N</b>	3	3	3	3	3	3	3	3
<b>nt</b>	9	9	9	9	9	9	9	9
<b>GM (CP)</b>	21.49	24.01	20.49	24.32	26.86	22.02	21.98	21.35
<b>AM (CP)</b>	21.66	24.29	20.57	24.53	27.08	22.18	22.08	21.42
<b>Min (CP)</b>	18.28	18.53	17.24	19.56	22.09	18.19	18.87	18.84
<b>Max (CP)</b>	25.14	28.12	23.25	29.49	31.51	25.73	24.96	24.81
<b>SD (<math>\pm</math>CP)</b>	2.60	3.48	1.60	2.69	2.98	2.32	1.78	1.45
<b>CV (%CP)</b>	12.01	14.32	7.77	10.96	10.99	10.45	8.07	6.78
<b>R</b>	0.87	0.91	0.97	0.92	0.98	0.98	0.98	0.97
<b>P</b>	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

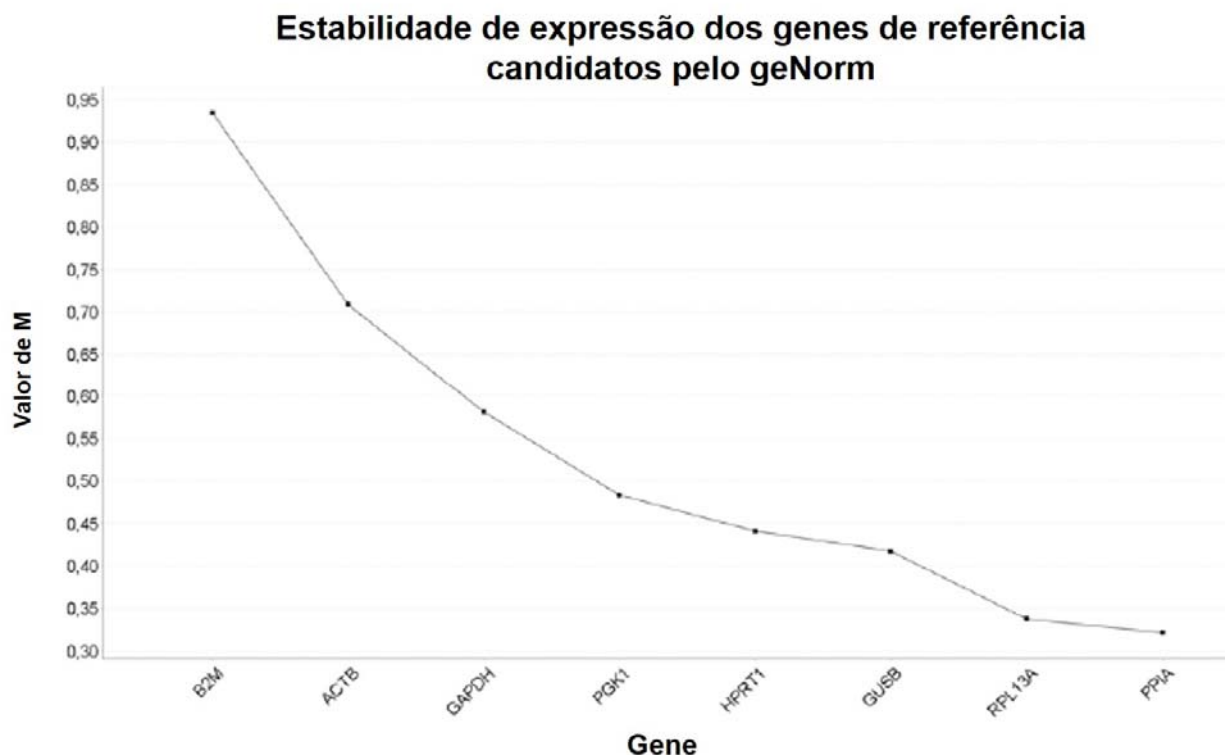
O algoritmo *NormFinder* foi utilizado para estimar a variação de expressão gênica intra e inter condições experimentais, considerando as diferenças. A alta estabilidade de expressão é indicada por valores pequenos, ou seja, quanto mais

próximo de zero, que já estão associados aos erros sistemáticos de cada gene de referência candidato (Andersen *et al.*, 2004). Logo, alta estabilidade de expressão gênica foi observada para *RPL13A* (Figure 18), sendo *RPL13A* e *GUSB* a melhor combinação sugerida de genes a serem utilizados como genes de referência pelo *NormFinder*.



**Figura 18:** Estabilidade de expressão dos genes de referência candidatos classificados por *NormFinder* nas condições experimentais Ctrl (resultados obtidos no qPCR utilizando cDNA na condição controle, ou seja, sob condições normais de cultura), 6h+lam (resultados obtidos no qPCR utilizando cDNA de células cultivadas sobre laminina por 6hs) e 24h+lam (resultados obtidos no qPCR utilizando cDNA de células cultivadas sobre laminina por 24hs).

O algoritmo *geNorm* foi utilizado para classificar os genes de referência candidatos testados de acordo com sua média de estabilidade de expressão (valor de M). A maioria dos genes estáveis são apresentados com baixo valor de M ( $M \leq 0.5$ ) enquanto altos valores de M, limitando-se a 1,5, significa que o gene é pouco estável (Vandesompele *et al.*, 2002). Todos os genes de referência candidatos apresentaram baixos valores de M. Contudo, a normalização ótima dada pelo valor de M foi encontrada para *RPL13A*, *PPIA* e *GUSB*, sugerindo estes genes como altamente estáveis e com baixa variação quando combinados (Figure 19).



**Figura 19:** Estabilidade de expressão dos genes de referência candidatos classificados por *geNorm* nas condições experimentais Ctrl (resultados obtidos no qPCR utilizando cDNA na condição controle, ou seja, sob condições normais de cultura), 6h+lam (resultados obtidos no qPCR utilizando cDNA de células cultivadas sobre laminina por 6hs) e 24h+lam (resultados obtidos no qPCR utilizando cDNA de células cultivadas sobre laminina por 24hs).

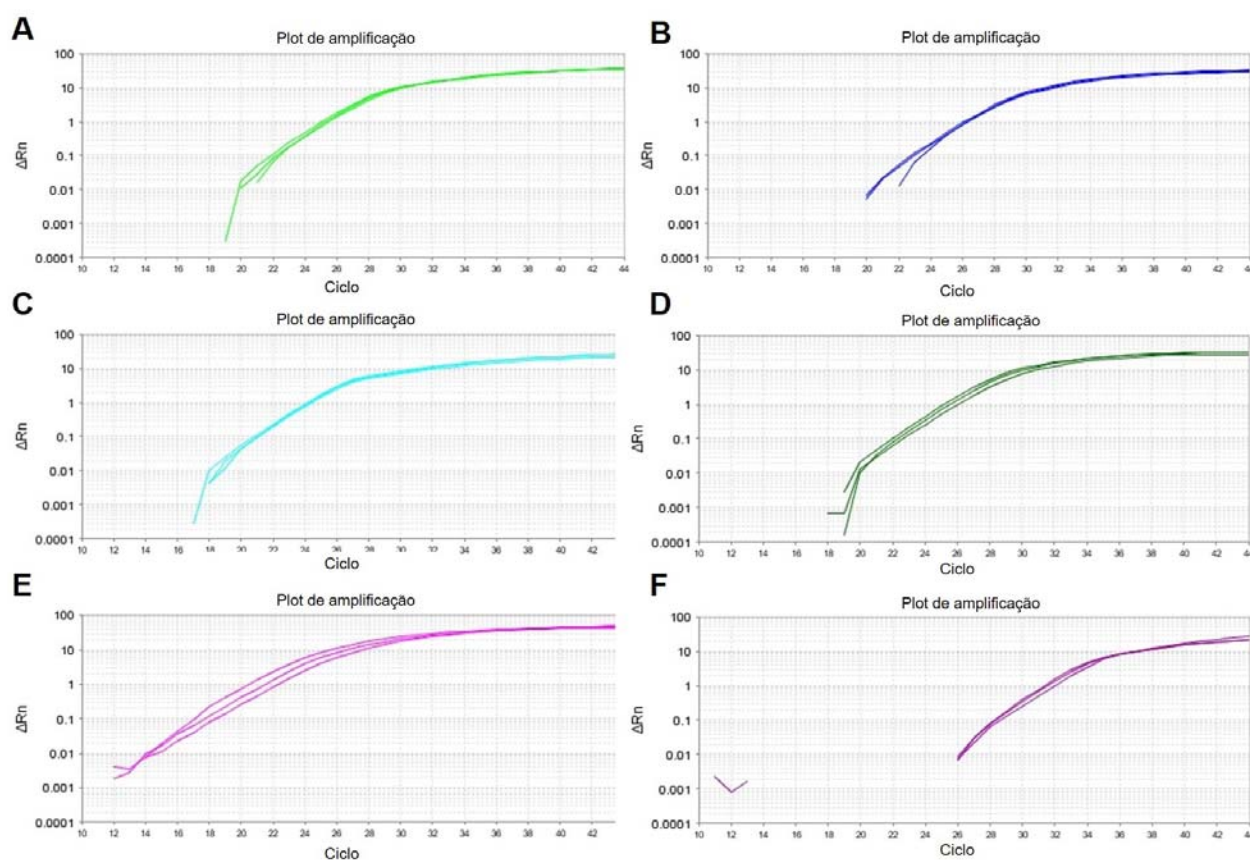
### 5.2.6 Expressão das subunidades de integrinas e o efeito do peptídeo A9a sobre a expressão das integrinas

Nesta etapa, após a identificação dos genes de referência adequados à normalização dos experimentos de qPCR, foi realizado um ensaio inicial apenas com cDNA obtido de células sob condições normais de cultura (Ctrl) e *primers* do kit *Integrin Signalling Array (GenOne)* a fim de identificar as subunidades de integrinas presentes na linhagem de macrófagos J774A1. Foi observado que sob condições normais de cultura (Ctrl) os macrófagos da linhagem J774A1 expressavam os genes correspondentes as subunidades de integrina  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$  e  $\beta 3$ , que conhecidamente estão envolvidas na adesão e migração celular (Figura 20). Este resultado é compatível com os dados obtidos no PCR *Hot Start/Touchdown* onde foram identificadas as subunidades  $\beta 1$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$  e  $\beta 3$  (Figura 15).

Para investigar se o peptídeo cíclico A9a era capaz de interferir na expressão das subunidades de integrinas, foi realizado qPCR utilizando o mesmo kit de *primers Integrin Signalling Array (GenOne)* (Tabela 7) utilizando cDNA proveniente de macrófagos cultivados sobre laminina por 6hs e por 24hs e ainda, cultivados sobre

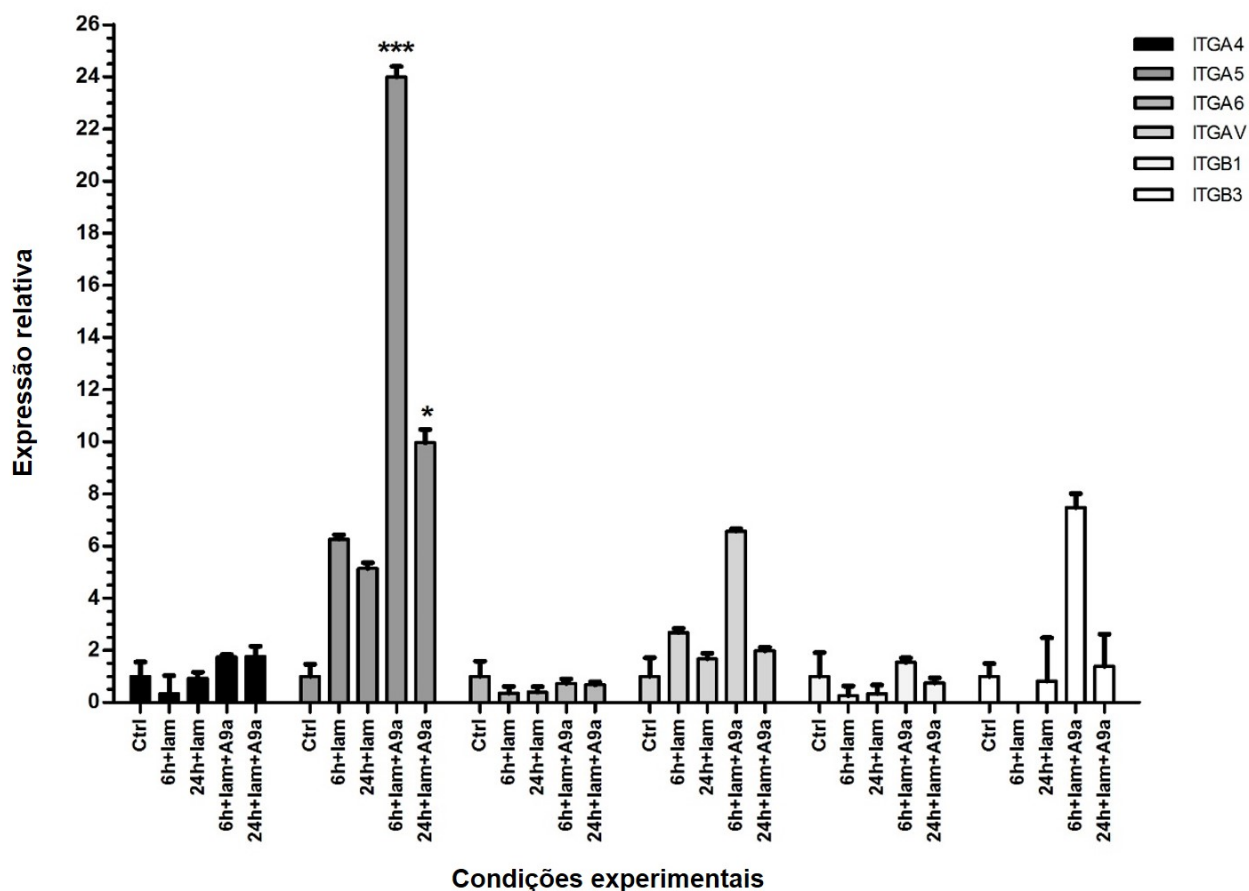


laminina e tratados com A9a e células por 6 e 24hs. Foi observado que 100nM de A9a aumenta de modo estatisticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ) a expressão da subunidade de integrina  $\alpha 5$ , iniciando após 6hs (6h+lam) de incubação até às 24hs (24h+lam) de experimento. No entanto, estudos *in silico* apontam a integrina  $\alpha 6\beta 1$  como alvo principal do peptídeo cíclico A9a, a qual é formada pelas subunidades  $\alpha 6$  e  $\beta 1$  cujo genes não apresentaram alterações na expressão quando comparado as condições normais de cultura (Ctrl) assim como das subunidades de integrina  $\alpha 4$ ,  $\alpha v$  e  $\beta 3$  (Figura 21).



**Figura 20:** *Plot de amplificação* apresentado pelo programa *StepOne v2.1* demonstrando a expressão das subunidades de integrinas presentes na linhagem celular J774A1 de macrófagos em condições normais de cultura (Ctrl). Cores correspondentes: *ITGA4*=A, *ITGA5*=B, *ITGA6*=C, *ITGAV*=D, *ITGB1*=E, *ITGB3*=F.

## Expressão das subunidades de integrina



**Figura 21:** Expressão dos genes das subunidades de integrinas em macrófagos da linhagem J774A1 sob condições normais de cultura (Ctrl), cultivados sobre laminina por 6hs (6h+lam), cultivados sobre laminina por 24hs (24h+lam), cultivados sobre laminina e tratados com 100nM A9a por 6hs (6h+lam+A9a) e cultivados sobre laminina e tratados com 100nM A9a por 24hs (24h+lam+A9a). Os valores representam média±desvio padrão de 3 repetições, cada um com 3 replicatas (n=9). A quantificação relativa foi estimada pela equação  $RQ=2^{-\Delta\Delta CT}$ . As barras representam o desvio padrão e asteriscos (\*) mostram a significância estatística (\* $p<0,05$ ; \*\*\* $p<0,001$ ; n=9).

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 O peptídeo cíclico A9a como modulador negativo de macrófagos em laminina

Neste estudo demonstramos que o peptídeo cíclico antagonista A9a desenhado previamente específico para  $\alpha 6\beta 1$  é responsável por modular negativamente a adesão, a migração e a proliferação de macrófagos em laminina sem alterar o padrão de expressão desta integrina.

Apesar dos macrófagos não possuírem extrema afinidade de adesão por laminina como por BSA (Kao, 2002), ainda há margem da adesão por componentes da ECM para visualizar a inibição da adesão, migração e proliferação celular. Esse é um fato importante já que laminina está amplamente envolvida na diferenciação, migração e ativação de linfócitos (Savino *et al.*, 2003) e também desempenha um papel importante na determinação do fenótipo agressivo de células tumorais durante o processo metastático (Sroka *et al.*, 2011). Tais processos celulares são mediados pelas integrinas, como  $\alpha 6\beta 1$ , principal receptor das lamininas, que quando ligadas à ECM resultam na regulação da transmigração de leucócitos e na ativação de diferentes vias de sinalização (Voisin; Nourshargh, 2007).

Sendo laminina a matriz proteica dos ensaios celulares, o peptídeo cíclico A9a de forma dose-dependente demonstrou ser capaz de modular negativamente a adesão celular. Em concentrações ínfimas (0,15nM) foi possível observar que o peptídeo é capaz de reduzir a adesão celular com significância estatística, atingindo aproximadamente 80% de eficiência quando utilizadas ainda concentrações em escala nM (7,5nM). Sugere-se que tal fato ocorra porque o peptídeo cíclico A9a interage entre as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da integrina  $\alpha 6\beta 1$ , como demonstrado em estudos *in sílico* por Fernandez *et al.* (2007) e Coronado (2008), uma vez que esta é a região conhecida como o sítio de interação preferencial que a integrina  $\alpha 6\beta 1$  utiliza para ligar-se com a laminina (Kamata *et al.*, 2001), impedindo a interação com o domínio  $\alpha$  dessa proteína de ECM. Cabe salientar que tal interação do peptídeo A9a só é possível devido a sua estrutura rígida e em forma de *loop*, que pode ser mantida quando em solução aquosa (Fernandez *et al.*, 2007).

Com base nessa informação e considerando que o evento de migração celular depende do evento aderência celular (Schenkel *et al.*, 2004), foram realizados ensaios de migração em *transwell* os quais mostraram que uma vez diminuída a adesão celular por mínimas concentrações de A9a, a migração celular em laminina também é reduzida

por meio de mínimas concentrações (1nM), corroborando com a ideia de interação A9a- $\alpha$ 6 $\beta$ 1. Lund *et al.* (2013) demonstraram evento semelhante onde antagonistas inibem a interação com integrinas  $\alpha$ V,  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 e  $\alpha$ 9 $\beta$ 1 de macrófagos as quais interagem com osteopontina através da ligação no domínio RGD e SLAYGLR, regulando a migração, sobrevivência e acumulação destas células em patologias inflamatórias crônicas.

Além disso, em consonância com os resultados acima discutidos estão os dados obtidos com o ensaio de cicatrização. O peptídeo cíclico A9a em mínimas concentrações foi capaz de modular negativamente a adesão, migração e a proliferação celular durante o período de até 30h. Após este período observa-se o crescimento normal da cultura celular, fechando a lesão. Isso ocorre provavelmente pela degradação intracelular ou extracelular do antagonista A9a, o que permite que ele seja metabolizado pelas células (Palm *et al.*, 2007), cessando sua ação de modulação negativa.

É notório que ao decorrer de todos os experimentos, as células permaneceram viáveis, sem alterações da função mitocondrial, apoptose ou necrose, sugerindo que o peptídeo cíclico A9a não é tóxico para estas células, como demonstrado pelo ensaio colorimétrico de MTT em diversas concentrações. Logo, infere-se que os processos de modulação negativa ocorreram apenas pela ação do peptídeo cíclico A9a e não por letalidade. Em contraste, os peptídeos Cilengitide e 1A-RGD, ambos antagonistas baseados na ligação com o domínio RGD dos ligantes, demonstraram suscitar apoptose ou necrose de células (Wang *et al.*, 2014; Russo *et al.*, 2013; Shao *et al.*, 2013).

De modo interessante, a modulação negativa da adesão, migração e proliferação de macrófagos em laminina pelo peptídeo cíclico A9a foram atingidas com concentração mínimas do antagonista, como descrito acima. E, estas concentrações foram no mínimo 395 vezes menor do que as necessárias para obter efeitos semelhantes com outros peptídeos antagonistas, salientando a ausência de toxicidade e/ou apoptose. Deve-se enfatizar que 0,1nM de A9a foi suficiente para demonstrar efeitos moduladores negativos do peptídeo cíclico, enquanto 0,20nM a 0,25 foi quantidade do peptídeo em particular necessária para inibir o processo de adesão celular em 50% (IC<sub>50</sub>). Já, o IC<sub>50</sub> para Cilengitide, o qual induz apoptose, e para 1A-RGD foi a 79nM e 20 $\mu$ M respectivamente (Sykoutri *et al.*, 2013; Russo *et al.*, 2013). Para a inibição da motilidade celular endotelial e a proliferação celular mediada pelo

678, específico para trombospondina-1 e antagonista de  $\alpha 3\beta 1$ , também é necessária uma elevada concentração do peptídeo (30 $\mu$ M) (Chandrasekaran *et al.*, 2000).

Tais resultados obtidos com a cultura de macrófagos em laminina enfatizam a eficiência do peptídeo cíclico A9a. De acordo com Russo *et al.* (2013), moléculas antagonistas que interagem com integrinas podem representar uma ferramenta promissora para a abordagem farmacológica destinada a reduzir a adesão e migração de células cancerígenas.

## 6.2 Confirmação da presença de $\alpha 6\beta 1$ em macrófagos da linhagem J774A1

A fim de validar a presença da integrina  $\alpha 6\beta 1$ , foi realizada avaliação das subunidades de integrina comumente encontradas nas linhagens celulares por meio do desenho e síntese de *primers* específicos para PCR *Hot Start/Touchdown*.

Na análise densitométrica dos produtos, foram observadas maiores quantidades de  $\beta 1$  e  $\alpha 5$ , seguido de  $\alpha 6$ , quando comparado a  $\alpha 11\beta$  e  $\beta 3$ . Sugerindo assim, expressão substancial de  $\alpha 5\beta 1$ , como já sugere a literatura para macrófagos (Kohn; Klingemann, 1991). Contudo, a integrina  $\alpha 5\beta 1$ , que se liga à fibronectina principalmente através da sequência RGD e PHSRN (Pro-His-Ser-Arg-Asn) (Cusachs *et al.*, 2009), não seria o alvo preferencial do peptídeo cíclico A9a de acordo com o modelo computacional. A integrina  $\alpha 11\beta 3$  é expressa em menor quantidade e se liga principalmente à vitronectina. Já a integrina  $\alpha 6\beta 1$ , receptor majoritário para família das lamininas (Chung *et al.*, 2004), também foi observada em quantidades elevadas. Logo, há quantidades consideráveis da integrina alvo proposta por estudos *in silico*, indispensável para ação do peptídeo cíclico A9a, corroborando com os resultados obtidos em biologia celular.

Cabe salientar que tais dados são provenientes de uma análise semi quantitativa. Assim, tornou-se primordial o uso de uma metodologia mais robusta como qPCR para ratificar estes resultados e também para checar a influência deste antagonista na expressão das subunidades de integrinas.

## 6.3 Escolha dos genes *RPL13A*, *PPIA*, *GAPDH* e *GUSB* como genes de referência para estudos de macrófagos relacionados à ECM

*A priori*, foi selecionado o set de genes de referência candidatos (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1*, *PGK1*, *PPIA* e *RPL13A*) conhecidamente associados a diversas funções celulares (Nelissen *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012). De fato, identificar

o gene de referência mais adequado e confiável entre várias condições de desenvolvimento e/ou experimentais contribui para o aperfeiçoamento dos desenhos experimentais e ainda para a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados de qPCR (Vandesompele *et al.*, 2002; Dheda *et al.*, 2004).

Utilizando cDNA de qualidade, os dados de qPCR com genes de referência candidatos foram plotados em diferentes programas para análises estatísticas uma vez que não existe um método universal para determinar os genes de referência específicos para cada condição experimental específica (Vandesompele *et al.*, 2002; Andersen *et al.*, 2004).

É importante mencionar que os genes *ACTB* e *B2M* foram identificados como os menos estáveis, mostrando valores contraditórios de  $\Delta\Delta Ct$ , altos coeficientes de variância e de estabilidade quando comparados aos demais genes de referência candidatos. Logo, estes dados indicam que estes genes não são indicados como bons genes de referência para macrófagos relacionados à laminina, sugerindo que a expressão destes genes pode ser remodelada frente aos componentes de ECM em culturas celulares ou são sensíveis à alguma sinalização de adesão celular. De modo similar, outros autores apontam *ACTB* com valores de qPCR contraditórios como em estudos utilizando oligodendrócitos e tecidos de encéfalo de ratos (Nelissen *et al.*, 2010; Bonfeld *et al.*, 2008). Também foi observado que *B2M* apresentou valores divergentes no qPCR utilizando tecido cardíaco humano (Molina *et al.*, 2014). Esses dados enfatizam a importância de avaliar os genes utilizados para normalização, mesmo quando já são tradicionalmente usados em outros estudos (Nelissen *et al.*, 2010).

Devido à similaridade entre os demais valores obtidos de  $\Delta\Delta Ct$  para os genes de referência candidatos, foram executadas as análises complementares utilizando os programas *BestKeeper*, *NormFinder* e *geNorm* que foram decisivas para identificar o gene de referência mais adequado. *BestKeeper* mostrou que os genes *GAPDH*, *PGK1*, *PPIA* e *RPL13A* possuem grande expressão e são estatisticamente estáveis em todas as condições experimentais utilizadas. De modo interessante, a análise de estabilidade de expressão por *NormFinder* indicou *RPL13A* e *GUSB* como a melhor combinação de genes estáveis a serem utilizados como normalizadores. Contudo, *geNorm* classificou *RPL13A*, *PPIA* e *GUSB* como alvos de mais alta estabilidade com baixa variação.

Certamente os resultados apresentados por cada programa não são idênticos, mas é possível notar que há inúmeras semelhanças nos resultados obtidos por

*BestKeeper*, *NormFinder* e *geNorm*. Este é um fato esperado devido as diferentes abordagens matemáticas de cada um dos programas utilizados para calcular a estabilidade de expressão (Artico *et al.*, 2010; Gimeno *et al.*, 2014). As lacunas deixadas entre as análises de diferentes programas podem potencialmente influenciar a seleção dos genes de referência (Kozera *et al.*, 2013; Jacob *et al.*, 2013). Isso enfatiza a necessidade de empregar mais de uma ferramenta para análise dos genes de referência candidatos, sendo esses genes com funções distantes para que não tenham uma regulação em comum.

Cabe salientar que, em todos os métodos de análise, *RPL13A* foi o gene de referência candidato mais estável em todas as condições experimentais. Estudos semelhantes sugerem que os membros da família *RPL* são bons candidatos para normalizadores em estudos utilizando tecido ovariano (Fu *et al.*, 2010), células de câncer de mama (Shah; Faridi, 2011), oligodendrócitos (Nelissen *et al.*, 2011) e células do intestino delgado (Matouskova *et al.*, 2014).

O gene *PPIA* também demonstrou expressão estável em todas as condições experimentais, logo, também pode ser considerado como adequado para normalizar reação de qPCR em macrófagos em laminina. Dados semelhantes foram observados em experimentos com células de ovários normais e cancerígenas (Jacob *et al.*, 2013). O gene *GUSB* foi indicado como gene estável pelo programa *geNorm* e sugerido como segundo melhor gene para ser utilizado como normalizador pelo programa *NormFinder*.

Já, o gene *GAPDH*, em diversos estudos, foi caracterizado como gene de expressão instável (Jacob *et al.*, 2013; Gimeno *et al.*, 2014; Matouskova *et al.*, 2014) uma vez que as condições experimentais podem facilmente alterar sua expressão (Barber *et al.*, 2005). Neste estudo, sugere-se reconsiderar o uso de *GAPDH* como gene de referência uma vez que demonstrou estabilidade de expressão e baixa variação pelo programa *BestKeeper* e valores de  $\Delta\Delta Ct$  em todas condições experimentais. A mesma observação foi realizada em estudos com lepidópteros, trigo e células uterinas de camundongos (Teng *et al.*, 2012; Janská *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2013).

Por fim, os genes *HTPR1* e *PGK1* apresentaram bons valores de estabilidade de expressão, porém, alto coeficiente de variância e desvio padrão entre as condições experimentais, descartando a possibilidade do uso desses genes como gene de referência.

Esta etapa de estudo foi capaz de fornecer orientações úteis sobre seleção de genes de referência para o estudo em macrófagos. Frente aos resultados apresentados pela análise por  $\Delta\Delta Ct$ , *BestKeeper*, *NormFinder* e *geNorm*, sugere-se que *RPL13A*, *PPIA*, *GAPDH* e *GUSB* são os genes de expressão mais estáveis, constantes e confiáveis para o uso como genes de referência normalizadores em estudos de macrófagos relacionados a ECM, tornando-se indispensável para desenhos experimentais de qPCR.

#### **6.4 O peptídeo cíclico A9a não altera a expressão de seu ligante específico**

Os experimentos de qPCR utilizando cDNA proveniente de culturas celulares que cresceram sobre laminina e incubadas com A9a por 6 e 24hs, demonstraram que o peptídeo cíclico não interferiu na expressão das subunidades de integrinas  $\alpha 6$  e  $\beta 1$ . Logo, os efeitos desse peptídeo na adesão, migração e proliferação de macrófagos não podem ser explicados pelo consequente efeito do antagonista sobre a expressão dessas subunidades de integrinas. Então, como esperado, sugere-se que o peptídeo cíclico A9a interage mecanicamente com a integrina  $\alpha 6\beta 1$ .

Entretanto, foi observado que o peptídeo cíclico A9a aumenta a expressão da subunidade de integrina  $\alpha 5$ , a qual não é o alvo original para o antagonista proposto. Especula-se que a interação mecânica do peptídeo cíclico A9a com a integrina  $\alpha 6\beta 1$  pode interferir com vias de sinalização, como observado em outros estudos que propõe antagonistas de integrinas, modificando a expressão de algumas proteínas. Contudo, não é possível determinar neste momento se este é realmente o caso ou qual via de sinalização o peptídeo cíclico A9a pode ter afetado. Também não se pode atribuir o efeito do peptídeo cíclico A9a à ligação com demais integrinas, uma vez que além de ser desenhado especificamente para a integrina  $\alpha 6\beta 1$ , a matriz utilizada foi específica para tal integrina (laminina).

Estudos realizados com macrófagos de camundongos da linhagem J774A1 em diferente ECM, como por exemplo fibronectina, não demonstraram resultados semelhantes aos obtidos neste estudo (dados não publicados - sob patente), corroborando para a hipótese de que o efeito é determinado por interação mecânica entre A9a- $\alpha 6\beta 1$  de modo singular, utilizando-se da região de interação preferencial pela laminina. Tal resultado foi previamente discutido e demonstrado em ensaios *in silico* por Fernandez *et al.* (2007) e Coronado (2008). Tal fato é notório uma vez que não limita a aplicabilidade do peptídeo cíclico A9a, reduzindo efeitos colaterais e/ou



sistêmicos. Divergentemente, Russo *et al.* (2013) indicam que o peptídeo 1A-RGD, que se liga especificamente às integrinas  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha IIb\beta 3$  e  $\alpha 5\beta 1$ , regulou negativamente a expressão das subunidades de integrina  $\alpha 5$  e  $\beta 1$ , além de FAK, o que os autores assumem contribuir com a modulação negativa da migração. Enquanto Cilengitide, específico para integrinas  $\alpha V\beta 3$  e  $\alpha II\beta 3$ , atribui os seus resultados à inibição da expressão de proteínas de vias de sinalização como FAK, Src e Akt (Oliveira-Ferrer *et al.*, 2008).

Estudos evidenciam que a integrina  $\alpha 6\beta 1$  está envolvida com a sobrevivência de células tumorais (Lamb *et al.*, 2011), processos inflamatórios (Bianchi-Frias *et al.*, 2010) e metastáticos (Stipp *et al.*, 2010; Fei *et al.*, 2012). Logo, considera-se macrófagos grandes alvos para terapias inflamatórias e tumorais (Becker *et al.* 2013). Até o momento, acredita-se que este é o primeiro estudo demonstrando a ação de um pequeno peptídeo cíclico capaz de interagir com a integrina  $\alpha 6\beta 1$ , modulando negativamente a adesão, migração e proliferação celular sem interferir na expressão dessa integrina. Além disso, esta ação ocorre com mínimas concentrações e não apresenta citotoxicidade.

Os dados aqui apresentados indicam o peptídeo cíclico A9a como um novo agente terapêutico em potencial para melhorar os resultados farmacológicos de processos inflamatórios ou de processos metastáticos. Ainda, o peptídeo cíclico A9a pode se tornar um interessante modelo a ser aplicado para desenho de outros peptídeos cíclicos, envolvendo outras integrinas em demais processos fisiopatológicos em diversas proteínas que compõe a ECM.

## 7 CONCLUSÕES

- I. Os macrófagos de camundongo da linhagem J774A1 apresentam adesão à matriz laminina utilizada no presente estudo;
- II. O peptídeo cíclico A9a aqui testado demonstrou ser capaz de modular negativamente a adesão celular com  $IC_{50}$  entre 0,20nM e 0,25nM, sendo 395 vezes e  $10^5$  vezes menor do que observado para os peptídeos cíclicos Cilengitide e 1A-RGD;
- III. Até 80% da adesão de macrófagos em laminina mediada apenas por integrinas foi modulada negativamente pelo peptídeo cíclico A9a;
- IV. A migração e proliferação de macrófagos da linhagem J774A1 em laminina foi modulada por meio de mínimas concentrações como 1nM e 100nM respectivamente;
- V. O peptídeo cíclico A9a não alterou a viabilidade celular e não induziu à apoptose ou necrose em 48hs, diferentemente de peptídeos cíclicos testados por outros autores, como Cilengitide e 1A-RGD;
- VI. Dentre as integrinas verificadas, foi observado que os macrófagos possuem 35 vezes mais subunidades  $\beta 1$ , 30 vezes mais subunidades  $\alpha 5$ , seguido de 20 vezes mais subunidades  $\alpha 6$ , e 10 vezes mais subunidades  $\alpha 11b$  quando comparado a expressão das subunidades  $\beta 3$ ;
- VII. Os macrófagos de camundongo da linhagem J774A1 apresentam a integrina  $\alpha 6\beta 1$ ;
- VIII. Os genes *RPL13A*, *PPIA*, *GAPDH* e *GUSB* são considerados os mais estáveis e precisos como normalizadores de qPCR para estudos de macrófagos relacionados à ECM;

- IX. Ocorreram alterações significativas da expressão da subunidade  $\alpha 5$ , uma vez que ela é superexpressa na presença da concentração de 100nM do peptídeo cíclico A9a;
  
- X. Não ocorreram alterações significativas na expressão de integrina  $\alpha 6\beta 1$  na presença da concentração de 100nM do peptídeo cíclico A9a, sugerindo fortemente a interação mecânica entre peptídeo-ligante.

## 8 PERSPECTIVAS

O presente estudo cumpriu todas as etapas propostas para avaliar a ação do peptídeo cíclico A9a na linhagem J774A1 de macrófagos de camundongo. Outras vertentes desse trabalho foram direcionadas à um processo de patenteamento, que apesar de tratar-se de outro peptídeo cíclico, contribuiu no desenvolvimento do pensamento sobre a ação do antagonista A9a. Contudo, como em qualquer pesquisa de base, sabe-se que a partir de resultados preliminares como tal, surgem novas lacunas a serem preenchidas.

Estudos *in vitro* sobre as vias de sinalização, como FAK, ERK, Ras e Akt auxiliariam a complementar os resultados, ratificando informações e fornecendo novas linhas de abordagem para o peptídeo cíclico A9a. Esta etapa de trabalho está sendo elaborada em colaboração com a Professora Vanessa Morais Freitas da Universidade de São Paulo (USP), Instituto de Ciências Biomédicas, Laboratório de Biologia da Matriz Extracelular. Ainda, futuras abordagens com diferentes bases celulares e em diferentes ECM podem fornecer informações importantes sobre a aplicabilidade do antagonista. E, até mesmo, modificações que podem ser feitas em sua composição de aminoácidos que possam aperfeiçoar sua atividade. Parte desta etapa está sendo realizada pela aluna de mestrado Paula Macêdo Cunha, orientanda do professor Jorge Hernandez Fernandez (UENF - CBB - LQFPP), em colaboração com o professor Milton Kanashiro, desta mesma universidade, porém do Laboratório de Biologia do Reconhecer.

Cabe salientar que estudos *in vivo* seriam capazes de enfatizar a atividade do peptídeo A9a, aprofundando a abordagem dos resultados aqui obtidos. Logo, estudos em camundongos podem demonstrar os efeitos colaterais e sistêmicos que dificilmente são visualizados *in vitro*, principalmente durante eventos metastáticos. Tal etapa com o peptídeo A9a será inserida na rotina do grupo de trabalho do laboratório em um futuro próximo.

## 9 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 6ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- ABRAM, C. L.; LOWELL, C. A. Clare L. The Ins and Outs of Leukocyte Integrin Signaling. **Annual Review of Immunology**, v.27, p.339-62, 2009.
- ALAM N, GOEL HL, ZARIF MJ, BUTTERFIELD JE, PERKINS HM, SAWYER TK, LANGUINO, L. R. The integrin-growth factor receptor duet. **Journal of Cell Physiology**, v.213, n.3, p.649–53, 2007
- ALBEDA, S. M.; METTE, S. A.; ELDER, D. E.; STEWART, R. M.; DAMJANOVICH, L.; HERLYN, M.; CLAYTON, C. A. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the  $\beta 3$  subunit with tumor progression. **Cancer Research**, v.50, p.6757-64, 1990.
- ALBELDA, S. M.; BUCK, C. A. Integrins and other cell adhesion molecules. **Faseb Journal**. v.4, n.11, p.2868-80, 1990.
- ALBERTS; B.; BRAY; D.; LEWIS, J. **Biologia molecular da célula**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1396 p.
- ALLAVENA, P.; SICA, A.; GARLANDA, C.; MANTOVANI, A. The Yin-Yang of tumor associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. **Immunology Reviews**, v.222, p.155-61, 2008.
- ANDERSEN, C.; JENSEN, J.; ORNTOFT, T. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v.64, n.15, p.5245-50, 2004.
- APLIN A. E., HOWE A., ALAHARI S. K.; JULIANO R. L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: The role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules and selectins. **Pharmacological Reviews**, v.50, p.197-263, 1998.
- ARENAS, L. A. S.; ZURBARÁN, C. B. La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. **Salud Uninorte Barranquilla**, v.16, p.9-18, 2002.
- AROSIO, D.; CASAGRANDE, C.; MANZONI, L. Integrin-mediated drug delivery in cancer and cardiovascular diseases with peptide-functionalized nanoparticles. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p.3128-51, 2012.
- ARTICO, S.; NARDELI, SM.; BRILHANTE, O.; GROSSI-DE-AS, M. F. and ALVES-FERREIRA, M. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. **BMC Plant Biology**, v.10, n.49, p.49-61, 2010.

ASSOIAN, R. K.; SCHWARTZ, M. A. Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell cycle progression. **Current Opinion in Genetics Development**, v.11, p.48-53, 2001.

AUMAILLEY, M.; BRUCKNER-TUDERMAN, L.; CARTER, W. G.; DEUTZMANN, R.; EDGAR, D.; EKBLUM, P.; ENGEL, J.; ENGVALL, E.; HOHENESTER, E.; JONES, J. C. R.; KLEINMAN HK, MARINKOVICH MP, MARTIN GR, MAYER U, MENEGUZZI G, MINER JH, MIYAZAKI K, PATARROYO M, PAULSSON M, QUARANTA V, SANES JR, SASAKI T, SEKIGUCHI K, SOROKIN LM, TALTS JF, TRYGGVASON K, UITTO J, VIRTANEN I, VON DER MARK K, WEWER UM, YAMADA Y, YURCHENCO PD. A simplified laminin nomenclature. **Matrix Biology**, v.24, p.326-32, 2005.

AVRAAMIDES, C. J.; GARMY-SUSINI, B.; VARNER, J. A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nature Reviews in Cancer**, v.8, p.604-617, 2008.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v.357, p.539-45, 2001.

BARBER, R. D.; HARMER, D. W.; COLEMAN, R. A.; CLARK, B. J. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. **Physiologic Genomics**, v.21, n.3, p.389-95, 2005.

BARCZYC, M.; CARRACEDO, S.; GULLBERG, D. Integrins. **Cell Tissue Research**, v.339, p.269-80, 2010.

BECKER, J. C.; ANDERSEN, M. H.; SCHRAMA, D.; THOR-STRATEN, P. 2013. Immune-suppressive properties of the tumor microenvironment. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, v.62, n.7, p.1137-48, 2013.

BEST, L.; DUNLOP, M.; MALAISSE, W. J. Phospholipid metabolism in pancreatic islets. **Experience**, v.40, p.1085-91, 1984.

BEVILACQUA, M. P.; NELSON, R. M. Selectins. **The Journal of Clinical Investigation**, v.91, p.379, 1993.

BIANCHI-FRIAS, D.; VAKAR-LOPEZ, F.; COLEMAN, I. M.; PLYMATE, S. R.; REED, M. J.; NELSON, P. S. The effects of aging on the molecular and cellular composition of the prostate microenvironment. **PLoSOne**, v.5, n.9, p. e12501, 2010

BIANCHI-SMIRAGLIA, A.; PAESANTE, S.; BAKIN, A. V. Integrin  $\beta 5$  contributes to the tumorigenic potential of breast cancer cells through the Src-FAK and MEK-ERK signaling pathways. **Oncogene**, v.32, p.3049-58, 2013.

BIGLER, D.; TAKAHASHI, Y.; CHEN, M. S.; ALMEIDA, E. A.; OSBOURNE, L.; WHITE, J. M. Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 2

(fertilin beta) and murine eggs. Role of the alpha(6) integrin subunit. **Journal of Biology and Chemistry**, v.275, p.11576-11584, 2000.

BILL, H.; KNUDSEN, B.; MOORES, S.; MUTHUSWAMY, S.; RAO, V.; BRUGGE, J.; MIRANTI, C. K. Epidermal growth factor receptor-dependent regulation of integrin-mediated signaling and cell cycle entry in epithelial cells. **Molecular Cell Biology**, v.24, p.8586-99, 2004.

BLACK, R. A.; WHITE, J. M. ADAMs: focus on the protease domain. **Current Opinion on Cell Biology**, v.10, p.654-659, 1998.

BLOBEL, C. P. Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. **Cell**, v.90, p.589-92, 1997.

BONACA, M. P.; STEG, P. G.; FELDMAN, L. J.; CANALES, J.F.; FERGUSON, J. J.; WALLENTIN, L.; CALIFF, F. M.; HARRINGTON, R. A.; GIUGLIANO, R. P. Antithrombotics in acute coronary syndromes. **Journal of American College of Cardiology**, v.54, n.11, p.969-84, 2009.

BONAPACE, L.; COISSIEUX, M.; WYCKOFF, J.; MERTZ, K. D.; VARGA, Z.; JUNT, T.; BENTIREN-ALJ, M. Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting angiogenesis. **Nature Letters**, v.6, n.515, p.130-33, 2014.

BONEFELD, B. E.; BETINA, E.; WEGENER, G. Reference Genes for Normalization: A Study of Rat Brain Tissue. **Synapse**, v.62, n.4, p.302-09, 2008.

BORGHOUTS, C; KUNZ, C; GRONER, B. Current strategies for the development of peptide-based anti-cancer therapeutics. **Journal of Peptide Science**, USA, v.11, n.11, p.713-26, 2005.

BROWN, E.; HOGG, N. Where the outside meets the inside: integrins as activators and targets of signal transduction cascades. **Immunology Letters**, v.54, p.189-193, 1996.

BURRIDGE, K.; CHRZANOWSKA-WODNICKA, M. Focal adhesions, contractility, and signaling. **Annual Reviews of Cell Development Biology**, v.12, p.463-519, 1996.

BURRIDGE, K.; FATH, K.; KELLY, T.; NUCKOLLS, G.; TURNER, C. A. Focal adhesions: transmembrane junction between the extracellular matrix and the cytoskeleton. **Annual Review of Cell Biology**, v.4, p.487-525, 1988.

CALOF, A. L.; CAMPANERO, M. R.; O'REAR, J. J.; YURCHENCO, P. D.; LANDER, A. D. Domain-specific activation of neuronal migration and neurite outgrowth-promoting activities of Laminina. **Neuron**, v.13, p.117-130, 1994.

CHANDRASEKARAN, L.; HE, C.; AL-BARAZI, H.; KRUTZSCH, H.; IRUELA-ARISPE, M. L.; ROBERTS, D. D. Cell Contact-dependent Activation of  $\alpha 3\beta 1$  Integrin Modulates

Endothelial Cell Responses to Thrombospondin-1. **Molecular Biology of the Cell**, v.11, n.9, p.2885-2900, 2000.

CHUNG, C. H.; WU, W. B.; HUANG, T. F. Aggrexin, a snake venom-derived endothelial integrin  $\alpha 2\beta 1$  antagonist, induces angiogenesis via expression of vascular endothelial growth factor. **Blood**, v.103, p.2105-2112, 2004.

CLEGG, D. O.; WINGERD, K. L.; HIKITA, S. T.; TOLHURST, E. C. Integrins in the development, function and dysfunction of the nervous system. **Frontiers in Bioscience**, v.8, p.723-750, 2003.

CORONADO, M.A. **Estudo por modelagem e dinâmica molecular da interação da integrina  $\alpha 6\beta 1$  com o domínio tipo desintegrina de ADAM2 e ADAM9 humanas**. [Dissertação de mestrado]. Petrópolis: Laboratório Nacional de Computação Científica; 2008.

COX, D.; BRENNAN, M.; MORAN, N. Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. **Nature Reviews**, v.9, p.804-20, 2010.

CRAIG, D.; GAO, M.; SCHULTEN, K.; VOGEL, V. Structural insights into how the MIDAS ion stabilizes integrin binding to an RGD peptide under force. **Structure**, v.12, n.11, p. 2049–2058, 2004.

CROSSIN, K.; KRUSHEL, L. Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. **Development Dynamics**, v.2, p.260-79, 2002.

CUSACHS, P. R.; GAUTHIER, N. C.; DEL RIO, A. SHEETZ, M. P. Clustering of  $\alpha 5\beta 1$  integrins determines adhesion strength whereas  $\alpha V\beta 3$  and talin enable mechanotransduction. **PNAS**, v.106, n.38, p.6245-1625, 2009.

DARRIBERE, T.; SKALKI, M.; COUSIN, H. L.; GAULTIER, A.; MONTMORY, C.; ALFANDARI, D. Integrins: Regulators of embryogenesis. **Biology of the Cell**, v.92, p.5-25, 2000.

DE MARZO, A. M.; PLATZ, E. A.; SUTCLIFFE, S.; XU, J.; GRONBERG, H.; DRAKE, C. G.; NAKAI, Y., ISAAC, W. B.; NELSON, W. G. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature Review Cancer**, v.7, n.4, p.256–69, 2007.

DE PALMA, M.; LEWIS, C. E. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. **Cancer Cell**, v.23, p.277-86, 2013.

DEDHAR, S.; HANNIGAN, G. E. Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. **Current Opinion in Cell Biology**, v.8, p.657-669, 1996.

DENARDO, D. G.; BRENNAN, D. J.; REXHEPAJ, E.; RUFFELL, B.; SHIAO, S. L.; MADDEN, S. F.; GALLAGHER, W. M.; WADHWANI, N.; KEIL, S. D.; JUNAID, S. A.; RUGO, H. S.; HWANG, E. S.; JIRSTRÖM, K.; WEST, B. L.; COUSSENS, L. M.



Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. **Cancer Discovery**. v.1, n.1, p.54-67, 2011.

DENNIS, M.S.; HENZEL, W.J.; PITTI, R.M.; LIPARI, M.T.; NAPIER, M.A.; DEISHER, T.A.; BUNTING, S.; LAZARUS, R.A., 1989. Platelet glycoprotein IIb – IIIa protein antagonist from snake venoms: evidence for a family of platelet-aggregation inhibitors. **PNAS**, v.87, p.2471-75, 1989.

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

DHEDA, K.; HUGGETT, J. F.; BUSTIN, S. A.; JOHNSON, M. A.; ROOK, G.; ZUMLA, A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. **Biotechniques**, v.37, n.1, p.112-19, 2004.

DIAMOND, M. S.; SPRINGER, T. A. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. **Current Biology**, v.4, p.506-17, 1994.

DIETRICH, T.; ONDERKA, J.; BOCK, F.; KRUSE, F. E.; VOSSMEYER, D.; STRAGIES, R.; ZAHN, G.; CURSIEFEN, C. Inhibition of Inflammatory Lymphangiogenesis by Integrin  $\alpha 5$  Blockade. **The American Journal of Pathology**, v.171, n.1, p.361-372, 2007.

DZAMBA, B.; BOLTON, M.; DESIMONE, D. **Frontiers in Molecular Biology, Cell Adhesion**. Oxford: Oxford University Press, p.100-154, 2001

EL AAMRI, F.; REMUZGO-MARTÍNEZ, S.; ACOSTA, F.; REAL, F.; RAMOS-VIVAS, J.; ICARDO, J. M.; PADILLA, D. Interactions of *Streptococcus iniae* with phagocytic cell line. **Microbes and Infection** v.17, n.4, p.258-65, 2015.

ELICES, M. J.; URRY, L. A.; HEMLER, M. E. Receptor functions for the integrin VLA-3: fibronectin, collagen and laminin binding are differentially influenced by Arg-Gly-Asp peptide and by divalent cations. **Journal of Cell Biology**, v.112, p.169-181, 1991.

EMSLEY, J.; KING, S. L.; BERGELSON, J. M.; LIDDINGTON, R. Crystal structure of the I domain from integrin  $\alpha 2\beta 1$ . **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.228512-17, 1997.

FEI, Y.; WANG, J.; LIU, W.; ZUO, H.; QIN, J.; WANG, D.; ZENG, H.; LIU, Z. CD151 promotes cancer cell metastasis via integrins  $\alpha 3\beta 1$  and  $\alpha 6\beta 1$  *in vitro*. **Molecular Medicine Reports**, v.6, n.6, p.1226-30, 2012.

FERNANDEZ, J. H.; SILVA, C. A.; ASSAKURA, M. T.; CAMARGO, A. C. M.; SERRANO, S. M. T. Molecular cloning, functional expression, and molecular modeling

of bothrostatin, a new highly active desintegrin from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.329, n.2, p.457-64, 2005.

FERNANDEZ, J. H.; CORONADO, M. A.; SILVEIRA, A. R.; SAVINO, W.; VASCONCELOS, A. T. R. **Modeling dynamics of integrin inhibition**. São Paulo: X-Meeting 2007, 2007.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicom**, v.45, n.8, p.969-85, 2005.

FU, J.; BIAN, L.; ZHAO, L.; DONG, Z.; GAO, X.; LUAN, H.; SUN, Y.; SONG, H. (2010). Identification of genes for normalization of quantitative real-time PCR data in ovarian tissues. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v.42, n.8, p.568-74. 2014.

GHANDOUR, H.; CULLERE, X.; ALVAREZ, A.; LUSCINSKAS, F. W.; MAYADAS, T. N. Essential role for Rap1 GTPase and its guanine exchange factor CalDAG-GEFI in LFA-1 but not VLA-4 integrin-mediated human T-cell adhesion. **Blood**, v.110, p.3682-90, 2007.

GIANCOTTI, F. G.; ROUSLAHTI, E. Elevated levels of the  $\alpha 5\beta 1$  fibronectin receptor suppresses the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. **Cell**, v.60, p.281-290, 1990.

GIANNIS, A.; RÜBSAM, F. Integrin antagonists and other low molecular weight compounds as inhibitors of angiogenesis: new drugs in cancer therapy. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 36, n. 6, p. 588-590, 1997.

GIEGER, B.; SPATZ, J. P.; BERSHADSKY, A. D. Environmental sensing through focal adhesions. **Nature Review Molecular Cell Biology**, v.10, p.21-33, 2009.

GIMENO, J.; EATTOCK, N.; VAN DEYNZE, A.; BLUMWALD, E. Selection and validation of reference genes for gene expression analysis in Switchgrass (*Panicum virgatum*) using quantitative real-time RT-PCR. **PLoSOne**, v.9, n.3, p.e91474, 2014.

GIVANT-HORWITZ, V.; DAVIDSON, B.; REICH, R. Laminin-induced signaling in tumor cell. **Cancer Letters**, v.223, n.1, 2005.

GUAN, J. L.; HYNES, R.O. Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor  $\alpha 4\beta 1$ . **Cell**, v.60, p.51-63, 1990.

HABER, E. P.; CURI, R.; CARVALHO, C. R. O.; CARPINELLI, A. R. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabologia** v.45, p.219-27, 2001.

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

HARRIS, E. S.; MCINTYRE, T. M.; PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A. The leukocyte integrins. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.23409-12, 2000.

HEMLER, M. E. VLA proteins in the integrin family: structures, functions and their role on leukocytes. **Annual Review of Immunology**, v.8, p.365-400, 1990.

HERSEY, P.; SOSMAN, J.; O'DAY, S.; RICHARDS, J.; BEDIKIAN, A.; GONZALES, R.; SHARFMAN, W.; WEBER, R.; LOGAN, T., BUZOIANU, M.; HAMERSHAIMB, L.; KIRKWOOD, J. M. A randomized phase 2 study of etaracizumab, a monoclonal antibody against integrin  $\alpha V\beta 3$  ± dacarbazine in patients with stage IV metastatic melanoma. **Cancer**, v.116, p.1526-34, 2010.

HOGERVORST, F.; KUIKMAN, I.; VON DEM BORNE, A. E.; SONNENBERG, A. Cloning and sequence analysis of beta-4 cDNA: an integrin subunit that contains a unique 118 kd cytoplasmic domain. **The EMBO Journal**, v.9, p.765-70, 1990.

HOGG, N.; PATZAK, I.; WILLENBROCK, F. The insider's guide to leukocyte integrin signaling and function. **Nature Reviews Immunology**, v.11, p.416-26, 2011.

HONDA, S.; SHIROTANI-IKEJIMA, H.; TADOKORO, S.; MAEDA, Y.; KINOSHITA, T.; TOMIYAMA, Y.; MIYATA, T. Integrin-linked kinase associated with integrin activation. **Blood**, v.113, p.5304-13, 2009.

HORWITZ, A. F. Integrins and Health. **Scientific American**, v.5, p.68-75, 1997.

HUMPHRIES, J. D.; WANG, P.; STREULI, C.; GEIGER, C.; HUMPHRIES, M. J. BALLESTREM, C. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. **Journal of Cell Biology**, v.179, n.5, p.1043-57, 2007.

HUMPHRIES, M. J. Integrin cell adhesion receptors and the concept of agonism. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.21, p.29-32, 2000.

HUMPHRIES, M. J.; MCEWAN, P. A.; BARTON, S. J.; BUCKLEY, P. A.; BELLA, J.; PAUL MOULD, A. Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. **Trends in biochemical sciences**, v.28, n.6, p.313-20, 2003.

HUNG, S.; INGBER, D. E. The structural and mechanical complexity of cell-growth control. **Natural Cell Biology**, v.1, n.5, p.E131-8, 1999.

HUTTENLOCHER, A.; HORWITZ, A. R. Integrins in Cell Migration. **Cold Spring Harbor Perspective in Biology**, v.3, p.1-16, 2011.

HWANG, J. Y.; MULLIGAN, B. P.; KIM, H. M.; YANG, B. C.; LEE, C. K. Quantitative analysis of sperm mRNA in the pig: relationship with early embryo development and capacitation. **Reproduction, Fertility and Development**, v.25, p.807-17, 2013.

HYNES, R. O. Cell adhesion: old and new questions. **Trends in Biochemistry Science**, v.24, p.33-37, 1999.

HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, v.6, n.110, p.673-687, 2002.

HYNES, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, v.69, p.11-25, 1992.

HYNES, R. O.; ZHAO, Q. The evolution of cell adhesion. **The Journal of Cell Biology**, v.150, p.89-95, 2000.

JACOB, F.; GUERTLER, R.; NAIM, S.; NIXDORF, S.; FEDIER, A.; HACKER, N. F.; HEINZELMANN-SCHWARZ, V. Careful selection of reference genes is required for reliable performance of RT-qPCR in human normal and cancer cell lines. **PLoSOne**, v.8, n.3, p.e59180, 2013.

JANSKÁ, A.; HODEK, J.; SVOBODA, P.; ZÁMEEM"K, J.; PRÁŠIL, I.; Vlasáková, E.; MILELLA, L.; OVESNÁ, J. The choice of reference gene set for assessing gene expression in barley (*Hordeum vulgare L.*) under low temperature and drought stress. **Molecular Genetics and Genomics**, v.288, n.11, p.639-49, 2013.

JIN, H.; VARNER, J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. **Brazilian Journal of Cancer**, v.90, p.561-565, 2004.

JIN, Y.; TONG, D.; CHEN, J.; FENG, Z.; YANG, J.; SHAO, C.; LI, J. Overexpression of osteopontin,  $\alpha\beta 3$  and Pim-1 associated with prognostically important clinicopathologic variables in non-small cell lung cancer. **PlosOne**, v.7, n.10, p. e48575, 2012.

JOHNSON, M. S.; LU, N.; DENESSIOUK, K.; HEINO, J.; GULLBERG, D. Integrins during evolution: evolutionary trees and model organisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1788, p.779-89, 2009.

JONES, J. L.; WALKER, R. A. Integrins: a role as cell signaling molecules. **Journal of Clinical Pathology and Molecular Pathology**, v.52, n.4, p.208–213, 1999.

KAMATA, T.; TIEU, K. K.; IRIE, A.; SPRINGER, T. A.; TAKADA, Y. Amino acid residues in the  $\alpha\text{IIb}$  subunit that are critical for ligand binding to integrin  $\text{IIb}\beta 3$  are clustered in the beta-propeller model. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.47, p.44275-83, 2001.

KAO, W. J. Biomimetics. In: DUMITRIU, S. **Polymeric Biomaterials**, Marcel Dekker Inc. Canada, 2002.

KARP, G. **Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiment**. 7.ed. New Jersey: Hoboken, 2010. 864p.

KATAGIRI, K.; KINASHI, T. Rap1 and integrin inside-out signaling. **Methods in Molecular Biology**, v.757, p.279-296, 2012.

KIEFFER, N.; PHILLIPS, D. R. Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions. **Annual Review of Cell Biology**, v.6, p.329-57, 1990.

KIM, S. H.; TUMBULL, J.; GUIMOND, S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. **Journal of Endocrinology**, v.209, p.139-151, 2011.

KINASHI, T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, v.5, p.546–559, 2005.

KOHN, F. R.; KLINGEMANN, H. G. Regulation of fibronectin receptor ( $\alpha 5\beta 1$ ) mRNA expression in human monocytes and monocytes-derived macrophages by activation/differentiation signals. **Experimental Hematology**, v.19, p.653-58, 1991.

KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. **J. Applied Genetics**, v.54, p.391-406, 2013.

KRATZSCHMAR, J.; LUM, L.; BLOBEL, C. P. Metargidin, a membrane anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence. **Journal of Biology and Chemistry**, v.271, p.4593-4596, 1996.

KREIDBERG, J. A.; SYMONS, J. M. Integrins in kidney development, function, and disease. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v.279, p.F233-F242, 2000.

KUMAR, C. C. Signaling by integrin receptors. **Oncogene**, v.17, p.1365-73, 1998.

KUMAR, V; ABBAS, A. K; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran: Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LAFLAME, S. E.; AUER, K. L. Integrin signaling. **Seminars in Cancer Biology**, v.7, p.111-118, 1996.

LAMB, L. E.; ZARIF, J. C.; MIRANTI, C. K. The Androgen Receptor Induces Integrin  $\alpha 6\beta 1$  to Promote Prostate Tumor Cell Survival via NF- $\kappa$ B and Bcl-xL Independently of PI3K Signaling. **Cancer Research**, v.71, p.2739-45, 2011.

LEE, J. O.; BANKSTON, L. A.; ARNAOUT, M. A.; LIDDINGTON, R. C. Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? **Structure** 3:1333-40, 1995.

LEGATE, K. R.; FASSLER, R. Mechanisms that regulate adaptor binding to beta integrin cytoplasmic tails. **Journal of Cell Science**, v.122, p.187-98, 2009.

LENZ, G. **Mecanismo de Transdução de Sinal Ativados por Purinas, Pirimidinas e Fatores de Crescimento em Culturas de Astrócitos**. [Tese de Doutorado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2000.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v.7, p.678-89, 2007.

LIM, J.; THOMPSON, J.; MAY, R. C.; HOTCHIN, N. A.; CARON, E. Regulator of G-protein signalling-14 (RGS14) regulates the activation of  $\alpha\beta 2$  integrin during phagocytosis. **PlosOne**, v.8, n.6, p.e69163, 2013.

LIN, P.; LAN, X.; CHEN, F.; YANG, Y.; JIN, Y.; WANG, A. Reference gene selection for real-time quantitative PCR analysis of the mouse uterus in the peri-implantation period. **PlosOne**, v.8, n.4, p.e62462, 2013.

LIPSCOMB, E. A.; SIMPSON, K. J.; RING, J. E.; DUGAN, A. S.; MERCURIO, A. M. The  $\alpha 6\beta 4$  integrin maintains the survival of human breast carcinoma cells in vivo. **Cancer Research**, v.65, p.10970-76, 2005.

LISSBRANT, I. F.; STATTIN, P.; WIKSTROM, P.; DAMBER, J. E.; EGEVAD, L.; BERGH, A. Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinic pathological variables and survival. **International Journal of Oncology**, v.17, n.3, p.445-51, 2000.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2(-\Delta\Delta C(T))$  method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LO, S. H.; CHEN, L. B. Focal adhesion as a signal transduction organelle. **Cancer Metastasis Reviews**, v.13, p.9-24, 1994.

LOECHEL, F.; FOX, J. W.; MURPHY, G.; ALBRECHTSEN, R.; WEWER, U. M. ADAM-12S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3. **Biochemistry Biophysics Research Communications**, v.278, p.511-515, 2000.

LOW, P. Y.; LIM, Y. C. Abstract B30: Upregulation of fibronectin expression on endothelial cells by tumor-conditioned macrophages facilitates lung metastasis in breast cancer. **Cancer Research**, v.75, p.B30, 2015.

LUND, S. A.; WILSON, C. L.; RAINES, E. W.; TANG, J.; GIACHELLI, C. M.; SCATENA, M. Osteopontin mediates macrophage chemotaxis via  $\alpha 4$  and  $\alpha 9$  integrins and survival via the  $\alpha 4$  integrin. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.114, p.1194-1202, 2013.

MAJOR, E. O. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies. **Annual Review of Medicine**, v.61, p.35-47, 2010.

MARÍN, A. M. J. **Caracterización molecular de las integrinas beta-1 (CD29) y beta 3 (CD61) porcinas. Obtención de anticuerpos contra dominios específicos de ambas moléculas** [Tese de doutorado]. Córdoba: Universidad de Córdoba, Departamento de GenéticaLaboratório; 2002.

MAS-MORUNO, C.; RECHENMACHER, F.; KESSLER, H. Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design synthesis and clinical evaluation. **Anticancer Agents at Medicinal Chemistry**, v.10, p.753-68, 2010.

MATOUSKOVA, P.; BARTIKOVA, H.; BOUSOVA, I.; HANUSOVA, V.; SZOTAKOVA, B.; SKALOVA, L. Reference genes for real-time PCR quantification of messenger RNAs and microRNAs in mouse model of obesity. **PLoSOne**, v.9, n.1, p.e86033, 2014.

MICHAEL, K.E.; DUMBAULD, D. W.; BUMS, K. L.; HANKS, S. K.; GARCIA, A. L. FAK modulates cell adhesion streng1hening via integrin activation. **Molecular Biology of the Cell**, v.20, p.2508-19, 2009.

MITRA, S. K.; HANSON, D. A.; SCHAEPPER, D. D. Focal adhesion kinase: In command and control of cell motility. **Nature Review Molecular Cell Biology**, v.6, p.56-68, 2005.

MIZEJEWSKI, G. J. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.222, n.2, p.124-38, 1999.

MOLINA, C. E.; BARBET, E.; JACQUET, E.; MUNOZ GUIJOSA, C.; BACZKO, I.; MAIER, L.; FISCHMEISTER, R.; GANIER, A. Identification of suitable reference genes for gene expression studies in normal and pathological human heart tissues. **Cardiovascular Research**, v.103, p.S57-S94, 2014.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophages activation. **Nature Reviews Immunology**, v.8, n.12, p.958-969, 2008.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. **Journal of Immunologic Methods**, v.65, n.1-2, p. 55-63.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v.11, p.723-37, 2011.

MYLES, D. G.; PRIMAKOFF P. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. **Biology Reproduction**, v.56, p.320-27, 1997.

NATH, D.; SLOCOMBE, P. M.; WEBSTER, A.; STEPHENS, P. E.; DOCHERTY, A. J.; MURPHY, G. Meltrin gamma(ADAM-9) mediates cellular adhesion through alpha6beta1

integrin, leading to a marked induction of fibroblast cell motility. **Journal Cell Science**, v.113, p.2319-2328, 2000.

NELISSEN, K.; SMEETS, K.; MULDER, M.; HENDRIKS, J. J. A.; AMELOOT, M. Selection of reference genes for gene expression studies in rat oligodendrocytes using quantitative real-time PCR. **Journal of Neuroscience Methods**. v.187, n.1, p.78-83, 2010.

NIEMIAROWSKI, S.; HUANG, T. F.; RUCINSKI, B.; COOK, J. J.; WILLIAMS, J. A.; MUSIAL, J.; EDUMUNDS Jr., L. H.; BUSH, L.; SHEBUSKI, R.; FRIEDMAN, P. A. Potential application of RGD containing peptides from viper venoms (disintegrins) in antiplatelet therapy. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.62, p.319, 1989.

NOY, R.; POLLARD, J. W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. **Immunity**, v.41, p.49-61, 2014.

OLIVEIRA-FERRER, L.; HAUSCHILD, J.; FIEDLER, W.; BOKEMEYER, C.; NIPPGEN, J.; CELIK, I.; SCHUCH, G. Cilengitide induces cellular detachment and apoptosis in endothelial and glioma cells mediated by inhibition of FAK/src/AKT pathway. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v.27, n.1, p.86, 2008.

OTA, D.; IKESUE, M.; MATSUI, Y.; ITO, K.; TAKADA, Y.; CHAMBERS, A. F.; 1, UEDE, T. The cell-to-cell interaction of breast cancer cells regulates cancer invasion via ADAM15. **American Journal of Immunology**, v.8, n.4, p.123-35, 2012.

LOUDIN, M. J.; BROYEL, L. C.; LUSSIEZ, A.; MILLER, M. A.; LAUFFENBURGER, D. A.; BEAR, J. E., GERTLER, F. B. Abstract 1988: MenalNV interaction with  $\alpha 5\beta 1$  promotes tumor cell invasion in response to gradients of growth factors and fibronectin. **Cancer Research**, v.1, p.74, 2014.

PALM, C.; JAYAMANNE, M.; KJELLANDER, M., HÄLLBRINK, M. Peptide degradation is a critical determinant for cell-penetrating peptide uptake. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v.1768, n.7, p.1769-1776, 2007.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v.26, p.509-15, 2004.

PHILLIPS, D. R.; CHARO, I. F.; SCARBOROUGH, R. M. GPIIb-IIIa: the responsive integrin. **Cell**, v.65, p.359-62, 1991.

PHILLIPS, D. R.; CHARO, I. F.; PARISE, L. V.; FITZGERALD, L. A. The platelet membrane Glycoprotein IIb-IIIa complex. **Blood**, v.71, p.831-43, 1988.

PLOW, E. F.; HAAS, T. A.; ZHANG, L.; LOFTUS, J.; SMITH, J. W. Ligand binding to integrins. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.21785-21788, 2000.



POLA, C.; FORMENTI, S. C.; SCHNEIDER, R. J. Vitronectin- $\alpha\beta 3$  integrin engagement directs hypoxia-resistant mTOR activity and sustained protein synthesis linked to invasion by breast cancer cells. **Cancer Research**, v.73, p.4571-8, 2013.

PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. The ADAM gene family: Surface proteins with adhesion and protease activity. **Trends Genetics**, v.16, p.83-7, 2000.

QIAN, B. Z.; LI, J.; ZHANG, H.; KITAMURA, T.; ZHANG, J.; CAMPION, L. R.; KAISER, E. A.; SNYDER, L. A.; POLLARD, J. W. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. **Nature**, v.475, p.222-25, 2011.

RAMAGE, L. Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. **Cell Health and Cytoskeleton**, v.4, p.1-9, 2012.

REARDON, D. A.; CHERESH, D. Cilengitide: a prototypic integrin inhibitor for the treatment of glioblastoma and other malignancies. **Genes Cancer**, v.12, n.2, p.1159-65, 2011.

RIES, C. H.; CANNARILE, M. A.; HOVES, S.; BENZ, J.; WARTHA, K.; RUNZA, V.; REY-GIRAUD, F.; PRADEL, L. P.; FEUERHAKE, F.; KLAMAN, I.; JONES, T.; JUCKNISCHKE, U.; SCHEIBLICH, S.; KALUZA, K.; GORR, I. H.; WALZ, A.; ABIRAJ, K.; CASSIER, P. A.; SICA, A.; GOMEZ-ROCA, C.; DE VISSER, K. E.; ITALIANO, A.; LE TOURNEAU, C.; DELORD, J. P.; LEVITSKY, H.; BLAY, J. Y.; RÜTTINGER, D. Targeting tumor-associated macrophages with Anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. **Cancer Cell**, v.25, p.846-59, 2014.

ROUSLAHTI, E. Specialization of tumor vasculature. **Nature Reviews**, v.2, p.83-90, 2002.

RUDICK, R. A.; PANZARA, M. A. Natalizumab plus interferon  $\beta 1a$  for relapsing multiple sclerosis. **NEJM**, n.354, p.911-23, 2006.

RUSSO, M. A.; PAOLILLO, M.; SANCHEZ-HERNANDEZ, Y.; CURTI, D.; CIUSANI, E.; SERRA, M.; COLOMBO, L.; SCHINELLI, S. A small-molecule RGD-integrin antagonist inhibits cell adhesion, cell migration and induces anoikis in glioblastoma cells. **International Journal of Oncology**, v.42, n.1, p.83-92, 2013.

SANTALA, P.; HEINO, J. Regulation of integrin-type cell adhesion receptor and by cytokines. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, p.23505-09, 1991.

SAUNDERS, N. A Real-time PCR. **Methods Molecular Biology**, v.266, p.191-211, 2004.

SAVINO, W.; AYRES MARTINS, S.; NEVES-DOS-SANTOS, S.; SMANIOTTO, S.; OCAMPO, J. S.; MENDES-DA-CRUZ, D. A.; TERRA-GRANADO, E.; KUSMENOK, O.;

VLLA-VERDE, D. M. Thymocyte migration: an affair of multiple cellular interactions? **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, v.36, n.8, p.1015-25, 2003.

SCAFFIDI, A. K.; PETROVIC, N.; MOODLEY, Y. P.; FOGEL-PETROVIC, M.; KROEGER, K. M.; SEEGER, R. M.; EIDNE, K. A.; Thompson, P. J.; Knight, D. A.  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  integrin interacts with the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) type II receptor to potentiate the proliferative effects of TGF- $\beta$ 1 in living human lung fibroblasts. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.3726-33, 2004.

SCHAFF, M.; TANG, C.; MAURER, E.; PHIL, M.; BOURDON, C.; RECEVEUR, N.; ECKLY, A.; HECHLER, B.; ARNOLD, C.; ARCANGELIS, A.; NIESWANDT, B.; DENIS, C. V.; LEFEBVRE, O.; GEORGES-LABOUESSE, E.; GACHET, C.; LANZA, F.; MANGIN, P. Integrin  $\alpha\text{6}\beta\text{1}$  is the main receptor for vascular laminins and plays a role in platelet adhesion, activation, and arterial thrombosis. **Circulation**, v.128, p540-52, 2013.

SCHENELLER, M.; VUORI, K.; ROUSLAHTI, E.  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  integrin associated with activated insulin and PDGF $\beta$  receptors and potentiates the biological activity of PDGF. **EMBO Journal**, v.16, p.5600-07, 1997.

SCHENKEL, A. R.; MAMDOUH, Z.; MULLER, W. A. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. **Nature Immunology**, v.5, p.393-400, 2004.

SCHWARTZ, M. A. Integrin signaling revisited. **Trends in Cell Biology**, v.11, p.466-70, 2001.

SEALS, D. F.; COURTNEIDGE, S. A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes Development**, v.17, p.7-30, 2003.

SHAH, K. N.; FARIDI, J. S. Estrogen, tamoxifen, and Akt modulate expression of putative housekeeping genes in breast cancer cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.125, n.3-5, p.219-25, 2011.

SHAO, G., ZHOU, Y., WANG, F.; LIU, S. Monitoring Glioma Growth and Tumor Necrosis with the U-SPECT-II/CT Scanner by Targeting Integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ . **Molecular Imaging**, v.12, n.1, p.39-48, 2013.

SHATTIL, J. S.; KASHIWAGI, H.; PAMPORI, N. Integrin signaling: The platelet paradigm. **Blood**, v.91, p.2645-57, 1998.

SHAW, L. M.; MERCURIO, A. M. Interferon gamma and lipopolysaccharide promote macrophage adherence to basement membrane glycoproteins. **Journal of Experimental Medicine**, v.169, p.303-08, 1989.

SILVA, T. H. A.; BUTERA, A. P.; LEAL, D. H. S.; ALVES, R. J. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese – Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina  $\alpha\beta 3$ . **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.43, n.1, 2007.

SILVA-BARBOSA, S. D.; SAVINO, W. The involvement of laminin in anti-myocardial cell autoimmune response in murine Chagas disease. **Developmental and Comparative Immunology**, v.7, p.293-301, 2000.

SMERLING, C.; TANG, K.; HOFMANN, W.; DANKER, K. Role of the  $\alpha 1$  integrin cytoplasmic tail in the formation of local complexes, actin organization, and in the control of cell migration. **Experimental Cell Research**, v.313, p.3153-65, 2007.

SPRINGER, T. A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**, v.346, p.425-34, 1990.

SRIDHAR, S.; MIRANTI, CK. Tetraspanin KAI1/CD82 suppresses invasion by inhibiting integrin-dependent crosstalk with c-Met receptor and Src kinases. **Oncogene**, v.25, p.2367-78, 2006.

SROKA, I. C.; SANDOVAL, C. P.; CHOPRA, H.; GARD, J. M.; PAWAR, S. C.; CRESS, A. E. Macrophage-dependent cleavage of the laminin receptor  $\alpha 6\beta 1$  in prostate cancer. **Molecular and Cancer Research**. v.9, n.10, p.1319-28, 2011.

STIPP, C. S. Laminin-binding integrins and their tetraspanin partners as potential antimetastatic targets. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.12, p.e3, 2010.

STUPP, R.; HEGI, M. E.; GORLIA, T.; ERRIDGE, S. C.; PERRY, J.; HONG, Y. K.; ALDAPE, K. D.; LHERMITTE, B.; PIETSCH, T.; GRUJICIC, D.; STEINBACH, J. P.; WICK, W.; TARNAWSKI, R.; NAM, D. H.; HAU, P.; WEYERBROCK, A.; TAPHOORN, M. J.; SHEN, C. C.; RAO, N.; THURZO, L.; HERRLINGER, U.; GUPTA, T.; KORTMANN, R. D.; ADAMSKA, K.; MCBAIN, C.; BRANDES, A. A.; TONN, J. C.; SCHNELL, O.; WIEGEL, T.; KIM, C. Y.; NABORS, L. B.; REARDON, D. A.; VAN DEN BENT, M. J.; HICKING, C.; MARKIVSKYY, A.; PICARD, M.; WELLER, M.; European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC); Canadian Brain Tumor Consortium; CENTRIC study team. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. **The Lancet Oncology**, v.10, n.15, p.1100-08, 2014.

SYKOUTRI, D.; GEETHA, N.; HAYER, S.; MANDI, P.; SMOLEN, J.S.; PRAGER, G.; REDLICH, K.  $\alpha\beta 3$  Integrin Inhibition with Cilengitide Both Prevents and Treats Collagen Induced Arthritis. **Annals of Rheumatic Disease**, v.72, n.1, p.A1-A88, 2013.

TAKADA, Y.; ELICES, M. J.; CROUSE, C.; HEMLER, M. E. The primary structure of  $\alpha 4$  subunit of VLA-4: homology to other integrins and possible cell-cell adhesion function. **EMBO Journal**, v.8, p.1361-68, 1989.

TAKEICHI, M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. **Development**, v.102, p.639-55, 1988.

TAN, S. The leucocyte  $\beta 2$  (CD18) integrins: the structure, functional regulation and signaling properties. **Bioscience Reports**, v.32, p.241-69, 2012.

TANG, X. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. **Cancer Letters**, v.332, p.3-10, 2013.

TENG, X.; ZHANG, Z.; HE, G.; YANG, L. and LI, F. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in four lepidopteran insects. **Journal of Insect Science**, 12, n.60, p.1-17, 2012.

TOQUET, C.; COLSON, A.; JARRY, A.; BEZIEAU, S.; VOLTEAU, C.; BOISSEAU, P.; MERLIN, D.; LABOISSE, C. L.; MOSNIER, J. F. ADAM15 to  $\alpha 5\beta 1$  integrin switch in colon carcinoma cells: a late event in cancer progression associated with tumor dedifferentiation and poor prognosis. **International Journal of Cancer**, v.130, p.278-87, 2012.

TRAD, A.; RIESE, M.; SHOMALI, M.; HEDEMAN, N.; EFFENBERGER, T.; GRÖTZINGER, J.; LORENZEN, I. The disintegrin domain of ADAM17 antagonises fibroblast-carcinoma cell interactions. *International Journal of Oncology*, v.42, n.5, p.1793-800, 2013.

VADALI, S.; POST, S. R. Lipid rafts couple class A scavenger receptors to phospholipase  $A_2$  activation during macrophage adhesion. **Journal of Leukocyte Biology**, v.96, p.873-881, 2014.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v.3, n.7, p.RESEARCH0034.1-11, 2002.

VAZEILLE, E.; BUISSON, A.; BRINGER, M. A.; GOUTTE, M.; OUCHCHANE, L.; HUGOT, J. P.; DE VALLÉE, A.; BARNICH, N.; BOMMELAER, G.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. Monocyte-derived Macrophages from Crohn's Disease Patients Are Impaired in the Ability to Control Intracellular Adherent-Invasive *Escherichia coli* and Exhibit Disordered Cytokine Secretion Profile. **Journal of Crohns Colitis**, v.9, n.5, p.410-20, 2015.

VERBISCK, N.V.; COSTA, É.T.; COSTA, F.F.; CAVALHER, F.P.; COSTA, M.D.M.; MURAS, A.; PAIXÃO, V.A.; MOURA, R.; GRANATO, M.F.; IERARDI, D.F.; MACHADO, T.; MELO, F.; RIBEIRO, K. B.; CUNHA, I. C; LIMA, V. C. C; MACIEL, M. S.; CARVALHO, A. L.; SOARES, F. F.; ZANATA, S.; SOGAYAR, M. C.; CHAMMAS, R.; CAMARGO, A. A. ADAM23 negatively modulates  $\alpha v\beta 3$  integrin activation during metastasis. **Cancer Research**, v.69, n.13, p.5546, 2009.

VOISIN, M.; NOURSHARGH, S. **Role of  $\alpha 6\beta 1$  integrin in leukocyte adhesion and transmigration.** In: Progress of Inflammation research. Birkhauser Verlag Basel/Switzerland, 2007.

WALSH, F. S.; DOHERTY, P. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. **Annual Review of Cell and Development Biology**, v.13, p.425-456, 1997.

WANG, L.; SOE, N. N.; SOWDEN, M.; XU, Y.; MODJESKI, K.; BASKARAN, P.; KIM, Y.; SMOLOCK, E. M.; MORRELL, C. N.; BERK, B. C. Cyclophilin A is an important mediator of platelet function by regulating integrin  $\alpha IIb\beta 3$  bidirectional signaling. **Thrombosis and Haemostasis**, v.111, n.5, p.873-82, 2014.

WANG, T.; LANG, Z.; SANDFORD, A. J.; XLONG, X.; YANG, Y.; JI, Y.; HE, J. Selection of suitable housekeeping genes for real-time quantitative PCR in CD4+ lymphocytes from asthmatics with or without depression. **PLoSOne**, v.7, n.10, p.e48367, 2012.

WILLIAMS A. F.; BARCLAY, A. N. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. **Annual Review of Immunology**, v.6, p.381-406, 1988.

WILLIAMS, M. J.; HUGHES, P. E.; O'TOOLE, T. E.; GINSBERG, M. H. The inner world of cell adhesion: integrin cytoplasmic domains. **Trends in Cell Biology**, v.4, p.109-12, 1994.

WOLFSBERG, T. G.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G.; WHITE, J. M. ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. **Journal of Cell Biology**, v.131, p.275-78, 1995.

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v.496, p.445-55, 2013.

XIONG, J. P.; STEHLE, T.; ZHANG, R.; JOACHIMIAK, A.; FRECH, M.; GOODMAN, S.L.; ARNAOUT, M.A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha V\beta 3$  in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. **Science**, v.296, n.5565, p.151-5, 2002.

YAMADA, K. M.; GEIGER, B. Molecular interactions in cell adhesion complexes. **Current Opinion and Cell Biology**, v.9, n.1, p.76-85, 1997.

YOSHIDA, H.; NISHIKAWA, M.; YASUDA, S.; TOYOTA, H.; KIYOTA, T.; TAKAHASHI, Y.; TAKAKURA, Y. Fibronectin inhibits cytokine production induced by CpG DNA in macrophages without direct binding to DNA. **Cytokine**, v.60, n.1, p.162-70, 2012.

YOSHIKAWA, K.; MITSUNAGA, S.; KINOSHITA, T.; KONISHI, M.; TAKAHASHI, S.; GOTOHDA, N.; KATO, Y.; AIZAWA M.; OCHIAI, A. Impact of tumor-associated

macrophages on invasive ductal carcinoma of the pancreas head. **Cancer Science**, v.103, n.11, p.2012-20, 2012.

ZAMANI TAGHIZADEH RABE, S.; MOUSAVI, S. H.; TABASI, N.; RASTIN, M.; ZAMANI TAGHIZADEH RABE, S.; SIADAT, Z.; MAHMOUDI, M. Rose Bengal suppresses gastric cancer cell proliferation via apoptosis and inhibits nitric oxide formation in macrophages. **Journal of Immunotoxicology**, v.11, n.4, p.367-75, 2014.

ZENT, R, POZZI, A. Angiogenesis in diabetic nephropathy. **Seminars of Nephrology**, v.27, n.2, p.161-71, 2007.

ZHANG, Y.; CHENG, S.; ZHANG, M.; ZHEN, L.; PANG, D.; ZHANG, Q.; LI, Z. High-Infiltration of Tumor-Associated Macrophages Predicts Unfavorable Clinical Outcome for Node-Negative Breast Cancer. **PLoSOne** v.8, p.9, p.e76147, 2013.

ZHU, X.; ASSOIAN, R. K. Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation. **Molecular Biology of the Cell**, v.6, p.273-82, 1995.

ZIGRINO, P.; NISCHT, R.; MAUCH, C. The Disintegrin-like and Cysteine-rich domains of ADAM-9 Mediate Interactions between Melanoma Cells and Fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, v.286, n.8, p.6801-07, 2011.