

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

IMPACTO DA INIBIÇÃO DE MIOSINA 1C (MYO1C) NO PROCESSO DE
ANGIOGÊNESE

Samuel Cota Teixeira

Uberlândia-MG
Setembro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

IMPACTO DA INIBIÇÃO DE MIOSINA 1C (MYO1C) NO PROCESSO DE
ANGIOGÊNESE

Tese apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em
Imunologia e Parasitologia
Aplicadas como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor.

Samuel Cota Teixeira

Orientador: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

Coorientadora: Dra. Daiana Silva Lopes

Uberlândia-MG
Setembro – 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

T266i Teixeira, Samuel Cota, 1993
2018 Impacto da inibição de miosina 1C (MYO1C) no processo de angiogênese [recurso eletrônico] / Samuel Cota Teixeira. - 2018.

Orientador: Claudio Vieira da Silva.

Coorientadora: Daiana Silva Lopes.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.492>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. 2. Neovascularização. 3. Miosinas. 4. Ciclo Celular.
I. Silva, Claudio Vieira da , (Orient.). II. Lopes, Daiana Silva,
(Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Samuel Cota Teixeira

“Impacto da inibição de miosina 1c (Myo1c) no processo de angiogênese”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e
Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 21 de setembro de 2018.

Patricia Bianca Clissa
Pesquisadora Dra. Patricia Bianca Clissa
IBU/SP

Thaís Gonçalves de Araújo
Profa. Dra. Thaís Gonçalves de Araújo
UFU-Patos de Minas

Angelica de Oliveira Gomes
Profa. Dra. Angelica de Oliveira Gomes
UFTM

Celene Maria de Oliveira Simões Alves
Profa. Dra. Celene Maria de O. S. Alves
ICBIM/UFU

Cláudio Vieira da Silva
Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva – coordenador
ICBIM/UFU

www.imunoparasito.ufu.br - E-mail: coipa@ufu.br - Telefax: (034) 3225-8672
Av. Amazonas, s/n - Bloco 4C, Sala 4C218 - Campus Umuarama
Uberlândia, MG, Brasil - CEP: 38.405-320

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus pais, Vani e Maurício,
por me ensinarem a fé, viverem a esperança e
me sustentarem em amor.*

Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.

E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.

E ainda que distribuísse toda a minha fortuna para sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria.

O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não trata com leviandade, não se ensoberbece.

Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, não se irrita, não suspeita mal;

Não folga com a injustiça, mas folga com a verdade;

Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.

O amor nunca falha; mas havendo profecias, serão aniquiladas; havendo línguas, cessarão; havendo ciência, desaparecerá;

Porque, em parte, conhecemos, e em parte profetizamos;

Mas, quando vier o que é perfeito, então o que o é em parte será aniquilado.

Quando eu era menino, falava como menino, sentia como menino, discorria como menino, mas, logo que cheguei a ser homem, acabei com as coisas de menino.

Porque agora vemos por espelho em enigma, mas então veremos face a face; agora conheço em parte, mas então conhecerei como também sou conhecido.

Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três, mas o maior destes é o amor.

1 Coríntios 13:1-13

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, ao meu bom, perfeito e maravilhoso Deus que esteve presente comigo dia após dia, concedendo-me paz, calma e direcionamento em todas as situações. Fez-me forte, quando estive fraco. Fez-me perseverar e continuar, quando pensei em desistir. Muito obrigado Senhor Jesus! Palavras não podem expressar toda a minha gratidão por tudo o que fez e tens feito em minha vida.

À minha família (pai, mãe e irmão) que sempre me apoiaram em todos os sentidos, principalmente, financeiramente e psicologicamente para lidar com os desafios, adversidades e dificuldades.

À minha namorada, Aléxia Pinheiro Morais que esteve comigo durante esses longos anos, sempre me motivando e apoiando.

À toda a equipe do Laboratório de Tripanosomatídeos (LATRI), pelo aprendizado e companheirismo. São tantos que nem me arrisco a citá-los, pois correria o risco de me esquecer de alguém. Todos vocês tiveram uma contribuição ímpar em minha formação acadêmica.

Ao meu professor e orientador, Claudio Vieira da Silva, por ter me recebido de braços abertos e pelas inúmeras possibilidades e oportunidades a mim oferecidas.

Ao Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais (LabiTTox) sob responsabilidade da Professora Dra. Veridiana Melo Rodrigues Ávila, que tanto me acolheram bem no período da realização de alguns experimentos deste trabalho.

Gostaria de agradecer a pós-doutoranda Daiana Silva Lopes do LabiTTox por todos os ensinamentos, e pela ampla disposição em me ajudar. Agradeço a Deus, pois além de uma coorientadora excelente, ganhei uma amiga que quero carregar no coração por toda a vida. Dai, muito obrigado por tudo mesmo. Só nós sabemos quantos gigantes tivemos que enfrentar para conseguirmos realizar esse e tantos outros trabalhos.

Por fim, aos técnicos da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para que esse trabalho fosse realizado.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP** - Adenosina difosfato
- ANG-1** - Angiopoietina-1
- AQP2** - Aquaporina-2
- ATII** - Células alveolares tipo II
- ATP** - Adenosina trifosfato
- bFGF** - Fator de crescimento básico de fibroblasto
- BM** - Membrana basal
- Ca²⁺** - Íon cálcio
- CaM** - Calmodulina
- CD** - *Cluster of differentiation*
- CDKs** - Quinases dependentes de ciclinas
- cDNA** - Ácido desoxirribonucleico complementar
- CKIs** - Inibidores de CDK
- C_T** - Ciclo limiar
- DDR_s** - Receptores de domínio de discoidina
- DIC** - Contraste de interferência diferencial
- DLL4** - *Delta-like protein 4*
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- DNase** - Desoxirribonuclease
- DSBs** - quebras da dupla fita de DNA
- ECM** - Matriz extracelular
- ECs** - Células endoteliais
- EGFL7** - *EGF like domain multiple 7*
- ERM** - Ezrina, radixina, moesina
- FAK** - Quinase de adesão focal
- FGFs** - Fatores de crescimento de fibroblastos
- FN** - Fibronectina
- GAGs** - Glicosaminoglicanos
- GLUT4** - Receptor de transporte de glicose 4
- HCl** - Ácido clorídrico
- HIF-2 α** - Fator induzível por hipóxia-2 α
- HUVECs** - Células endoteliais de cordão umbilical humano

MFI - Mediana da intensidade de fluorescência

MMPs - Metaloproteinases de matriz

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

MTT - *3-(4,5-dimetitiazol-2-il) -2,5-difenil-2H-tetrazólio*

Myo1c - Miosina de classe 1c

Myo1s - Miosinas de classe 1

NRARP - Proteína de repetição de anquirina regulada por NOTCH

NRPs - Neuropilinas

PAI-1 - Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1

PBS - Tampão fosfato-salino

PCIP - Pentacloropseudilin

PCNA - Antígeno nuclear de proliferação celular

PDGF-B - Fator de crescimento derivado de plaquetas B

PGs - Proteoglicanos

PH - Domínio de homologia a pleckstrina

PHD2 - Domínio de prolil hidroxilase 2

PI - Iodeto de propídio

PIP2 - Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato

PIGF - Fator de crescimento placentário

PPD - *Phenylenediamin*

PTK2 - Proteína tirosina quinase 2

RNA - Ácido ribonucleico

RNase - Ribonuclease

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute medium*

RT-qPCR - Reação em cadeia pela polimerase quantitativo em tempo real

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SFB - Soro fetal bovino

TAMs - Macrófagos associados a tumores

TGF-β - Fator de crescimento transformador-β

TH1 - Domínio de homologia 1

TIE-2 - Receptor tirosina quinase TEK

TIMPs - Inibidores teciduais das metaloproteinases

TUNEL - *Deoxinucleotidil terminal transferase*

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

VEGFRs - Receptores de fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE ABREVIATURAS – GENES

*Integrinas:

ITGA2 - *Integrin subunit alpha 2*

ITGA3 - *Integrin subunit alpha 3*

ITGA4 - *Integrin subunit alpha 4*

ITGA5 - *Integrin subunit alpha 5*

ITGB1 - *integrin subunit beta 1*

ITGB3 - *integrin subunit beta 3*

*Ciclo celular:

ATM - *Ataxia telangiectasia mutated*

CCNE1 - *Cyclin E1*

CCND1 - *Cyclin D1*

CDK2 - *Cyclin-dependent kinase 2*

CDK4 - *Cyclin-dependent kinase 4*

CDKN1A - *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*

CDKN2A - *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*

CDC25A - *Cell division cycle 25A*

CHEK1 - *Checkpoint kinase 1*

CHEK2 - *Checkpoint kinase 1*

*Gene de referência:

GAPDH - *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

* Os primers foram adquiridos da GO GENONE - HCAN-1® (Human Cancer Pathway Primer Library), Brasil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Bases moleculares da formação de vasos sanguíneos	20
Figura 2 – Viabilidade de células HUVECs tratadas com PCIP	39
Figura 3 – A inibição da Myo1c promoveu uma redução na formação de vasos <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>	40
Figura 4 - O bloqueio da atividade da Myo1c pelo PCIP inibiu a proliferação de ECs	41
Figura 5 - O tratamento com PCIP promoveu redução significativa na migração horizontal de células HUVECs.....	42
Figura 6 - O tratamento com PCIP promoveu redução significativa na migração vertical de células HUVECs.....	43
Figura 7 - A inibição da atividade da Myo1c alterou o padrão do citoesqueleto de actina e promoveu retração na área de ECs.....	44
Figura 8 - A inibição da Myo1c prejudica a adesão celular.....	48
Figura 9 - A inibição da Myo1c promove descolamento celular	49
Figura 10 - Bloqueio da atividade da Myo1c interfere em vias relacionadas com o tráfego intracelular de integrinas	52
Figura 11 - Análise da integridade do DNA e morte celular de células HUVECs tratadas com PCIP.....	54
Figura 12 - Inibição da Myo1c pelo PCIP interrompeu a progressão do ciclo celular e modulou a expressão de genes associados à progressão do ciclo.....	56
Figura 13 - Células HUVECs recuperam a capacidade proliferativa após a remoção do tratamento com PCIP	58

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS – GENES.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
Abstract	14
Resumo	15
1. Introdução	16
1.1 Angiogênese - características gerais	16
1.2 Bases moleculares da formação de vasos sanguíneos	17
1.3 O papel do citoesqueleto de actina na angiogênese	21
1.4 Características gerais da miosina 1c (Myo1c)	23
2. Justificativa	26
3. Objetivos.....	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4. Material e métodos	28
4.1 Local de estudo	28
4.2 Animais e ética.....	28
4.3 Cultivo celular.....	28
4.4 Síntese de pentacloropseudilin (PCIP).....	29
4.5 Viabilidade celular	29
4.6 Ensaio de angiogênese <i>in vitro</i>	30
4.7 Ensaio do anel aórtico de camundongo	30
4.8 Proliferação celular	31
4.9 Avaliação da migração horizontal e vertical de células HUVECs	31
4.10 Marcação de F-actina e quantificação da área celular	32
4.11 Adesão celular e descolamento celular de HUVECs.....	33
4.12 Expressão gênica.....	34
4.13 Citometria de fluxo para análise da expressão proteica.....	35

4.14 Análise de dano no DNA pelo método de TUNEL	35
4.15 Ensaio de apoptose.....	36
4.16 Análise do ciclo celular.....	36
4.17 Normas de biossegurança	37
4.18 Análise estatística	37
5. Resultados e discussão.....	38
5.1 A inibição da Myo1c pelo PCIP promove uma diminuição na formação de vasos sanguíneos.....	38
5.2 Bloqueio da atividade da Myo1c interfere em vias relacionadas com o tráfego intracelular de integrinas.....	46
5.3 Inibição da Myo1c mediada pelo tratamento com PCIP impede a progressão do ciclo celular na fase G1/S de ECs	53
6. Conclusão	59
7. Produção científica durante o doutorado	60
8. Referências bibliográficas.....	63
9. Anexos.....	77

Abstract

Class 1 myosins (Myo1s) were the first unconventional myosins identified. Myo1c, a Myo1 isoform, is involved in the regulation of gene expression, cytoskeletal rearrangements, delivery of proteins to the cell surface, cell migration and spreading. Thus, the important role of Myo1c in different biological processes is evident. Therefore, in the present study we investigated the effects of Myo1c inhibition triggered by Pentachloropseuduolin (PCIP), a reversible and allosteric potent inhibitor of Myo1c, on angiogenesis. We demonstrated that blocking of Myo1c activity by treatment with PCIP promoted a decrease in the number of vessels. The observed inhibition of angiogenesis is likely related to the inhibition of cell proliferation, migration, adhesion and alteration of the actin cytoskeleton pattern as shown on PCIP-treated HUVEC cell line. Moreover, we also demonstrated that PCIP treatment partially prevented the delivery of integrins to the plasma membrane. Finally, we showed that the inhibition of Myo1c caused DNA strand breaks, which is probably repaired during the cell cycle arrest in G1 phase. Taken together, our results suggest Myo1c as an attractive target for drug-based treatment of angiogenesis-related human diseases.

Keywords: Angiogenesis, Myo1c, pentachloropseuduolin, cell cycle.

Resumo

As miosinas de classe 1 (Myo1s) foram as primeiras miosinas não convencionais identificadas. Myo1c, uma isoforma de Myo1, está envolvida na regulação da expressão gênica, rearranjos do citoesqueleto, liberação de proteínas na superfície celular, migração celular, dentre outros. Diante do importante papel da Myo1c em diferentes processos biológicos, o presente estudo propôs investigar os efeitos da inibição da Myo1c desencadeada pelo pentacloropseudilin (PCIP), um potente inibidor reversível e alostérico de Myo1c, na angiogênese. Demonstramos que o bloqueio da atividade da Myo1c pelo tratamento com PCIP promoveu uma diminuição no número de vasos sanguíneos. Sugerimos que a inibição da angiogênese observada esteja relacionada com a inibição da proliferação celular, migração, adesão e alteração do padrão do citoesqueleto de actina, como observado em células HUVECs tratadas com PCIP. Além disso, também demonstramos que o tratamento com PCIP impediu parcialmente a entrega de integrinas à membrana plasmática. Finalmente, mostramos que a inibição da Myo1c causou quebras na fita de DNA, que provavelmente é reparada durante a parada do ciclo celular na fase G1. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a Myo1c é um alvo atraente para o tratamento de doenças humanas relacionadas à angiogênese.

Palavras-chave: Angiogênese, Myo1c, pentacloropseudilin, ciclo celular.

1. Introdução

1.1 Angiogênese - características gerais

A formação de novos vasos sanguíneos ou neovascularização, pode ocorrer por meio da angiogênese ou por vasculogênese. A vasculogênese é a criação de novos vasos *de novo* a partir de células precursoras, como os angioblastos, que se diferenciam em células endoteliais (ECs), formam lúmens e criam vasos sanguíneos primitivos (Uczian *et al.*, 2010). Em contraste, a angiogênese é definida como o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, o qual ocorre naturalmente durante toda a vida de um indivíduo, tanto em condições fisiologicamente saudáveis quanto em quadros patológicos (Carmeliet, 2003; 2004).

Vasos sanguíneos permitem que células do sistema imune patrulhem o organismo em um processo denominado de vigilância imunológica, fornecem oxigênio e suprem de nutrientes os tecidos, e descarte de resíduos oriundos dos mais diversos processos metabólicos (Carmeliet e Jain, 2011). Embora benéficos para o crescimento e regeneração dos tecidos, os vasos sanguíneos podem colaborar para a manutenção de doenças inflamatórias e malignas, e também são explorados por células malignamente transformadas durante a metástase tumoral, contribuindo para a perpetuação do câncer (Carmeliet, 2003; Carmeliet e Jain, 2011).

Como os vasos sanguíneos nutrem quase todos os órgãos do corpo e estão em um constante contato com estas estruturas, alterações no crescimento normal de vasos sanguíneos podem contribuir para inúmeras doenças. Por exemplo, o crescimento ou manutenção insuficiente de vasos sanguíneos pode levar ao desencadeamento de acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, distúrbios ulcerativos e neurodegeneração. Já o crescimento excessivo ou remodelamento anormal dos vasos pode provocar câncer, distúrbios inflamatórios, hipertensão pulmonar e doenças oftalmológicas (Carmeliet, 2003; Folkman, 2007; Carmeliet e Jain, 2011). A angiogênese normal é bem ordenada, previsível, regulada e não excessiva, enquanto que a angiogênese patológica é irregular e imatura devido a sua velocidade e natureza excessiva (Verheul *et al.*, 2004).

De forma geral, a angiogênese é um processo de múltiplas etapas que envolve ativação de ECs, degradação da membrana basal, invasão, proliferação, formação de lúmen e estabilização. Este processo é amplamente regulado por um balanço entre

moléculas que favorecem a formação de vasos (moléculas pró-angiogênicas) e moléculas que inibem a formação de vasos (moléculas anti-angiogênicas) (Bayless e Johnson, 2011). Neste contexto de formação de vasos, podemos incluir fatores de crescimento (Presta *et al.*, 2005; Turner e Grose, 2010), lipídios bioativos (English *et al.*, 2002; Hla, 2004), integrinas (Cheresh *et al.*, 1989; Brooks *et al.*, 1996; Davis e Camarillo, 1996; Senger *et al.*, 1997; Senger *et al.*, 2002; Davis e Bayless, 2003), proteínas juncionais (Bazzoni e Dejana, 2004; Dejana, 2004; Wallez e Huber, 2008) e proteinases transmembranas (Van Hinsbergh *et al.*, 2006; Van Hinsbergh e Koolwijk, 2008; Bayless e Johnson, 2011).

1.2 Bases moleculares da formação de vasos sanguíneos

Em um adulto saudável, ECs quiescentes possuem meia-vida longa e são protegidas contra injúrias pela ação autócrina de sinais de manutenção, como pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), receptor NOTCH, angiopoietina-1 (ANG-1) e fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs). Como os vasos sanguíneos estão em constante contato com o oxigênio, ECs expressam sensores de oxigênio e fatores induzíveis por hipóxia - como o domínio de prolil hidroxilase 2 (PHD2) e fator induzível por hipóxia-2 α (HIF-2 α), que permitem que os vasos reajustem sua forma para otimizar o fluxo sanguíneo. ECs quiescentes formam uma monocamada de células com uma superfície aerodinâmica, interconectadas por moléculas juncionais, como E-caderina e claudinas. Essas ECs são protegidas por pericitos, que inibem sua proliferação e liberam sinais de sobrevivência celular, como VEGF e ANG-1. As ECs e pericitos em condições de repouso, produzem uma membrana basal comum (Carmeliet e Jain, 2011)(**Figura 1A**).

Em um vaso sanguíneo normal, imediatamente abaixo da monocamada de ECs encontra-se uma espessa membrana basal (BM) de 100-200 μ m de espessura. Esta é composta principalmente de lamininas, colágenos tipo IV e VIII, e proteoglicanos. Esta BM deve ser degradada antes da invasão pelas ECs na matriz extracelular circundante (ECM), a qual é composta majoritariamente por colágenos fibrilares, elastinas e várias outras proteínas da ECM (Francis *et al.*, 2008; Ucuzian *et al.*, 2010). ECs, em resposta a estímulos angiogênicos (VEGF, VEGF-C, ANG-2, FGFs ou quimiocinas - liberados por células em condições de hipóxia), inflamatórios ou tumorais, convertem-se de um

fenótipo quiescente para um sinteticamente ativo, caracterizado por um alto índice mitótico e maior capacidade de migração e proteólise da matriz (Bergers e Hanahan, 2008; Murakami *et al.*, 2008; Carmeliet e Jain, 2011) (**Figura 1A**).

Frente ao estímulo angiogênico, pericitos se separam primeiro da parede do vaso (em resposta a ANG-2) e soltam-se da membrana basal por degradação proteolítica, a qual é mediada por metaloproteinases de matriz (MMPs). Células endoteliais ativadas rompem com suas junções intercelulares (junções de adesão e junções gap), e o vaso nascente se dilata (Risau, 1997; Armulik *et al.*, 2005). O VEGF presente no microambiente aumenta a permeabilidade da camada de células endoteliais, fazendo com que as proteínas plasmáticas, como fibrinogênio e fibronectina, extravasem e alcancem a ECM (Jain *et al.*, 2006). Em resposta à sinalização de integrinas (proteínas transmembrana de adesão), as células endoteliais migram para a superfície da ECM adjacente. Nestas, proteases presentes na matriz são ativadas, e passam a liberar moléculas pró-angiogênicas armazenadas na ECM, como VEGF e FGF, o que promove um remodelamento da ECM, tornando o ambiente favorável ao crescimento de novos vasos (Carmeliet e Jain, 2011) (**Figura 1A**).

A formação do lúmen (e subsequente formação de tubo) pode ser considerada um marco da angiogênese, pois é um comportamento relativamente específico, atribuído principalmente às células do epitélio e do endotélio. Esses mecanismos são garantidos, pois ECs são geneticamente programadas para criar compartimentos luminais dentro de cadeias multicelulares, o que permite o fluxo de sangue de uma rede de vasos preexistente para uma neovasculatura, sem a qual as novas redes capilares seriam incapazes de desempenhar sua função central de transporte de oxigênio e nutrientes (Uczian *et al.*, 2010) (**Figura 1A**).

Para construir um tubo perfundido e impedir que células endoteliais se movam em massa em direção ao sinal angiogênico, uma célula endotelial, conhecida como *Tip cell* (célula da ponta), é selecionada para conduzir/guiar a ponta do vaso em formação na presença de fatores angiogênicos como receptores de VEGF (VEGFRs), neuropilinas (NRPs) e os ligantes de receptores NOTCH, como DLL4 e JAGGED1 (Benedito *et al.*, 2009; Phng e Gerhardt, 2009; Adams e Eichmann, 2010; Jakobsson *et al.*, 2010) (**Figura 1A**). Células vizinhas à *tip cells* assumem posições subsidiárias como *stalk cells* (células estaminais), que se dividem para alongar o pedúnculo/haste em formação [são estimuladas por NOTCH, proteína de repetição de anquirina regulada por NOTCH

(NRARP), WNTs, fator de crescimento placentário (PIGF) e FGFs] e estabelecer o lúmen [mediado por E-caderina, CD34 (glicoproteína que atua como fator de adesão celular), sialomucinas, VEGF] (Carmeliet *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2008; Phng *et al.*, 2009; Dejana, 2010) (**Figura 1B**).

Tip cells são apresentam filopódios para detectar sinais de orientação ambiental, como efrinas, semaforinas, EGFL7 (fator angiogênico secretado, que atua como uma molécula quimioatraente para ECs e se liga a componentes da ECM para transmitir informações espaciais sobre a posição de células vizinhas), de modo a garantir a tubulogênese (Jakobsson *et al.*, 2010; Mosch *et al.*, 2010; Sawamiphak *et al.*, 2010). *Stalk cells* adjacentes às *tip cells* proliferam, alongam-se e formam um lúmen, e os brotos se fundem (Benedito *et al.*, 2009; Carmeliet e Jain, 2011) (**Figura 1B**).

Células de origem mielóide, como macrófagos associados a tumores (TAMs) e monócitos que expressam TIE-2 (um receptor associado com angiogênese expresso em células endoteliais e subpopulações de monócitos/macrófagos) são recrutados para auxiliarem na formação de vaso. Estas células, produzem fatores pró-angiogênicos ou liberam proteoliticamente fatores de crescimento angiogênico presentes na ECM, o que auxilia na fusão entre os ramos vasculares, permitindo o início do fluxo sanguíneo (De Palma *et al.*, 2005; Saharinen *et al.*, 2008; Augustin *et al.*, 2009) (**Figura 1B**).

Um vaso sanguíneo para se tornar funcional, precisa se tornar maduro e estável. As ECs retomam seu estado de quiescência, e sinais como fator de crescimento derivado de plaquetas B (PDGF-B), ANG-1, fator de crescimento transformador- β (TGF- β), efrina-B2 e NOTCH fazem com que as células fiquem cobertas por pericitos (De Palma *et al.*, 2005; Saharinen *et al.*, 2008; Augustin *et al.*, 2009; Sawamiphak *et al.*, 2010; Carmeliet e Jain, 2011). Juntamente com os pericitos, os inibidores de protease conhecidos como inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) e o inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) causam a deposição de uma membrana basal e as junções são restabelecidas para garantir a distribuição ótima do fluxo (Blasi e Carmeliet, 2002; Folkman, 2007) (**Figura 1C**).

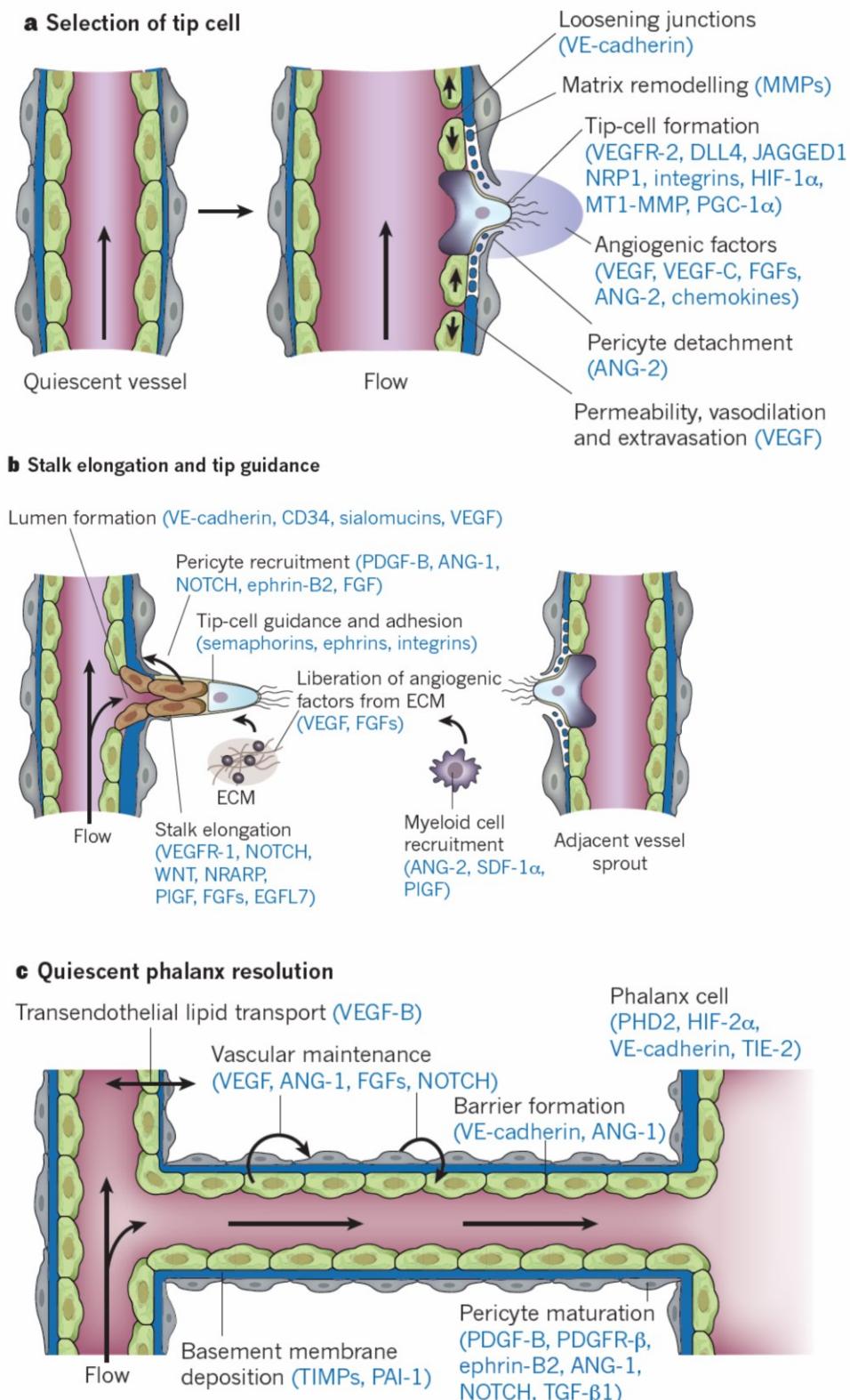


Figura 1 - Bases moleculares da formação de vasos sanguíneos. (A) Seleção de *tip cells* (células da ponta). (B) Alongamento do vaso em formação por *Stalk cells* (células estaminais). (C) Formação do vaso sanguíneo maduro e estável. Esta figura foi retirada e adaptada do artigo “*Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis*” de Peter Carmeliet & Rakesh K. Jain (Carmeliet e Jain, 2011).

1.3 O papel do citoesqueleto de actina na angiogênese

A actina é o principal componente do citoesqueleto de células endoteliais, o qual está relacionado com o controle da angiogênese. A actina é composta por subunidades globulares monoméricas de 43 kDa (G-actina) que polimerizam em filamentos helicoidais (F-actina). A montagem da F-actina está fortemente associada à hidrólise do ATP pela sua intrínseca atividade ATPásica. A G-actina monomérica ligada à Mg²⁺/ATP é incorporada nos filamentos em crescimento da extremidade farpada. ATP-actina é então convertida em ADP-actina, como monômeros de actina, os quais são deslocados ao longo dos filamentos em direção a extremidade pontiaguda (Tong *et al.*, 2006; Lamalice *et al.*, 2007).

O citoesqueleto de actina orquestra várias etapas tanto na angiogênese fisiológica quanto na patológica, o que requer uma contínua remodelação dependente do citoesqueleto (Carmeliet, 2003; 2004). O constante remodelamento do citoesqueleto de actina em filopódios, lamelipódios e fibras de estresse são essenciais para a migração celular durante a angiogênese. Os filopódios são projeções de membrana que contêm longos filamentos de actina paralelos dispostos em feixes estreitos. Os lamelipódios são protruções citoplasmáticas que se formam na borda de células em migração (Small *et al.*, 2002). Já as fibras de estresse são filamentos de actina de polaridade invertida ligados por α -actinina e miosina, e distribuídos ao longo de fibras contráteis (Small e Resch, 2005). Todas as 3 estruturas, acima mencionadas, são essenciais para conduzir os vários passos da motilidade celular endotelial baseada em actina durante a angiogênese: detecção do sinal motogênico (favorece a migração) por filopódios; formação e protrução de lamelipódios; fixação de protruções à matriz extracelular; contração mediada por fibras de estresse do corpo celular para permitir o movimento; reciclagem de moléculas adesivas e sinalizadoras (Lamalice *et al.*, 2007).

A migração de ECs durante a angiogênese se dá por meio de três mecanismos integrados: (1) quimiotaxia - migração direcionada para um gradiente de moléculas quimioatrativas solúveis; (2) haptotaxia - migração direcionada a um gradiente de ligantes imobilizados; (3) mecanotaxia - migração direcional gerada por forças mecânicas (Li *et al.*, 2005). Tipicamente, a quimiotaxia de ECs é desencadeada por fatores de crescimento, como VEGF e fator de crescimento básico de fibroblasto (bFGF). Em contrapartida, na haptotaxia o aumento da migração de ECs se dá em

resposta à ligação de integrinas a componentes da matriz extracelular (Klemke *et al.*, 1997; Giroux *et al.*, 1999; Lamalice *et al.*, 2007).

A rede de actina e suas proteínas associadas integram-se com vias de sinalização chaves conhecidas por regular a angiogênese (Thoenes e Gunther, 2008). O citoesqueleto de actina é preso à membrana plasmática através de junções aderentes e adesões focais nos contatos célula-célula e célula-matriz, respectivamente. O reconhecimento celular e a resposta celular à matriz extracelular são etapas essenciais para a angiogênese. Nesse sentido, diversos trabalhos na literatura demonstram que o bloqueio das subunidades de diferentes integrinas pode comprometer a formação de novos vasos (Drake *et al.*, 1992; Brooks *et al.*, 1994; Drake *et al.*, 1995; Bayless *et al.*, 2000; Perruzzi *et al.*, 2003). Isso se dá pelo fato que ao inibir a atividade de integrinas, como a integrina $\alpha v\beta 3$, há um comprometimento da fosforilação da cauda citoplasmática da integrina, impedindo o recrutamento de proteínas adaptadoras intracelulares do citoesqueleto de actina (Phillips *et al.*, 2001; Mahabeleshwar *et al.*, 2007).

Somado a isso, foi observado que a integrina $\alpha 2\beta 1$ (reconhece colágeno tipo I presente na ECM) se liga, através de seu domínio citoplasmático, à Cdc42 (uma GTPase da família de proteínas Rho – reguladores chaves do citoesqueleto de actina), desencadeando a formação do lúmen endotelial (Sacharidou *et al.*, 2010). Esses dados evidenciam como o reconhecimento de um substrato pró-morfogênico (como o colágeno tipo I) presente na ECM pode induzir o crescimento de novos vasos e a formação do lúmen endotelial, o que se dá por meio do acoplamento do reconhecimento da matriz (via $\alpha 2\beta 1$) com rearranjos do citoesqueleto (via Cdc42) (Davis e Senger, 2008; Sacharidou *et al.*, 2010).

Diversos trabalhos na literatura científica enfatizam como as várias redes do citoesqueleto integram-se e respondem às principais vias de sinalização conhecidas por regular a angiogênese, além das acima mencionadas. Nesse sentido, a contínua descoberta de novos compostos que visam componentes do citoesqueleto e normalizam a angiogênese desregulada fornecerá ferramentas adicionais para combater a angiogênese patológica (Bayless e Johnson, 2011).

1.4 Características gerais da miosina 1c (Myo1c)

O citoesqueleto de células eucarióticas é uma rede interconectada que fornece suporte e organização às células, sendo constituído principalmente pelos filamentos de actina, filamentos intermediários e microtúbulos. Além de desempenhar funções estruturais, esses filamentos atuam como trilhas para o movimento de motores moleculares que convertem a energia química em trabalho mecânico à medida que transportam e/ou ancoram organelas, vesículas e outros componentes intracelulares. Cinesina e dineína, são proteínas motoras que fazem uso dos microtúbulos para o transporte. Miosinas são proteínas motoras que fazem uso da actina para o transporte (Goode *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 2008; Hartman *et al.*, 2011).

As miosinas fazem parte de uma superfamília de proteínas motoras (divididas em pelo menos 24 classes) que se ligam e hidrolisam ATP para gerar força e movimento ao longo dos filamentos de actina (Richards e Cavalier-Smith, 2005). Estão envolvidas em uma ampla gama de vias celulares, desde atividades baseadas no citoesqueleto de actina, como a organização do citoesqueleto, transporte de material ao longo da célula, gerando forças e atuando como sensores de forças no citoesqueleto (Krendel e Mooseker, 2005; Woolner e Bement, 2009; Geeves, 2016).

As miosinas de classe I (Myo1s), foram as primeiras miosinas não-convencionais identificadas e são amplamente expressas em células eucarióticas (Pollard e Korn, 1973; McConnell e Tyska, 2010). Humanos apresentam oito isoformas de Myo1s (Myo1a até Myo1h) (Greenberg e Ostap, 2013). As Myo1s atuam como *linkers* (pontes) entre membranas lipídicas e o citoesqueleto de actina em diferentes processos celulares. Apresentam um domínio principal N-terminal de ligação à actina e nucleotídeos, uma região de ligação à calmodulina e um domínio C-terminal de ligação à membranas (Barylko *et al.*, 2005; McConnell e Tyska, 2010). A região C-terminal de ligação à membranas contém um domínio de homologia a pleckstrina (PH), que permite uma associação direta entre miosina e lipídeos ácidos de membrana, como fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) (Hokanson *et al.*, 2006). A atividade de Myo1s é regulada pelos níveis intracelulares de cálcio (Ca^{2+}), que se ligam a calmodulina e causam sua dissociação da região de ligação à calmodulina (Lin *et al.*, 2005). Dentre as oito isoformas de miosinas classe 1 conhecidas em vertebrados, as miosinas 1a, 1c e 1b são as mais bem caracterizadas (Kittelberger *et al.*, 2016).

A Myo1c encontra-se envolvida em inúmeros processos celulares, como regulação da expressão gênica, formação e manutenção da motilidade celular e transporte de G-actina durante a migração celular (De La Cruz e Ostap, 2004; Dzijak *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2012; Sarshad *et al.*, 2013). Vários estudos têm evidenciado o papel da Myo1c no transporte intracelular de vesículas. Por exemplo, Bose e colaboradores (2004), observaram que a Myo1c está diretamente envolvida no processo de fusão de vesículas contendo o receptor de transporte de glicose 4 (GLUT4) com a membrana plasmática em células musculares e adipócitos (Bose *et al.*, 2004). Além disso, Barile *et al.* (2005) demonstraram que a Myo1c está associada ao controle do tráfego de vesículas contendo aquaporina-2 (AQP2) para a região apical de células do duto renal (Barile *et al.*, 2005). Associado a isso, foi descrito o papel da Myo1c na entrega de proteínas associadas à balsas lipídicas à superfície celular (Brandstaetter *et al.*, 2012) e foi demonstrado que a Myo1c é responsável por regular o transporte de VEGFR2 em ECs. Esse envolvimento da Myo1c com a sinalização de VEGFR2, foi evidenciado através de ensaios que revelaram que ausência de Myo1c levou a redução de VEGFR2 na membrana plasmática de ECs (Tiwari *et al.*, 2013).

Atualmente, evidências consideráveis apontam a participação direta da Myo1c em vias de sinalização que estão intimamente ligadas ao desenvolvimento de doenças, como artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, distrofia muscular, diabetes, obesidade e doença de Alzheimer – vide revisão em (Bond *et al.*, 2013). Portanto, o uso de inibidores específicos para Myo1c pode se tornar uma importante ferramenta para uma melhor compreensão do papel desta proteína. Neste sentido, Martin *et al.* (2009), sintetizaram um composto altamente halogenado contendo uma porção de 2-aryl-pirrol, chamado de *Pentacloropseudolin* (PCIP), que atua como um seletivo, reversível e alostérico potente inibidor das atividades ATPásica e motora de Myo1c em células de mamíferos (Martin *et al.*, 2009; Chinthalapudi *et al.*, 2011). Sugere-se que o mecanismo de inibição alostérica desencadeado pelo PCIP provavelmente esteja relacionado à pequenas alterações conformacionais na dinâmica da proteína e uma modulação direta entre os sítios catalíticos e alostéricos presentes na Myo1c (Martin *et al.*, 2009).

Em 2016, Kittelberger e colaboradores, ao investigar a localização e função de Myo1c durante a exocitose de corpos lamelares (grânulos secretórios contendo surfactantes) em células alveolares tipo II (ATII), observaram que Myo1c transloca-se para a membrana de corpos lamelares fusionados à membrana plasmática de forma

dependente do domínio de homologia à pleckstrina (PH) e dos níveis intracelulares de Ca^{2+} . Além disso, observaram que a inibição de Myo1c mediada por PCIP causou redução significativa na exocitose de vesículas em células ATII (Kittelberger *et al.*, 2016). Somada a isto, recentemente também foi observado, por meio da inibição da Myo1c por PCIP, alteração na forma da membrana e distribuição de actina cortical em modelos de embriões de *Zebrafish* (Gupta *et al.*, 2017). Contudo, ainda não existem trabalhos que apontem o envolvimento direto de Myo1c no processo de formação de vasos sanguíneos.

2. Justificativa

Baseando-se no importante papel que os vasos sanguíneos desempenham tanto em processos saudáveis quanto em patológicos, o estudo da angiogênese têm aplicações clínicas em vários campos, incluindo doença vascular periférica e coronária, oncologia, hematologia, cicatrização de feridas, dermatologia, oftalmologia, dentre outras. Estudos experimentais demonstram que a promoção de processos pró-angiogênicos podem ter benefício terapêutico em tecidos isquêmicos, enquanto nas últimas décadas o estudo de terapias anti-angiogênicas produziram vários fármacos para procedimentos quimioterapêuticos no campo da oncologia (Uczian *et al.*, 2010; Carmeliet e Jain, 2011).

Somado a isso, nos últimos anos a literatura científica tem apontado o envolvimento da Myo1c em diferentes processos e vias de sinalização, os quais são essenciais para a formação de vasos sanguíneos, conforme foi mencionado acima (Bond *et al.*, 2013). Assim, a angiogênese é um processo complexo, amplamente regulado e que envolve diferentes etapas. Neste contexto, vimos que a Myo1c (importante componente do citoesqueleto de actina) regula e participa de diferentes vias. Logo, descrever seu papel na angiogênese auxiliará na compreensão desse processo, bem como corroborar no entendimento e tratamento de diferentes patologias.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos da inibição da Myo1c desencadeada pelo composto sintético PCIP na angiogênese.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade do PCIP sobre células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs);
- Verificar o impacto da inibição de Myo1c na formação de vasos sanguíneos *in vitro* e *ex vivo*;
- Investigar o impacto do bloqueio da atividade da Myo1c desencadeada pelo PCIP nas etapas básicas do processo de angiogênese: proliferação, migração e adesão celular;
- Verificar a influência da Myo1c no citoesqueleto de actina de HUVECs;
- Analisar o envolvimento da Myo1c em vias relacionadas com o tráfego intracelular de integrinas;
- Avaliar o efeito da inibição de Myo1c na integridade do DNA de ECs;
- Investigar o impacto da inibição da atividade da Myo1c no conteúdo de DNA (ciclo celular) e no perfil de expressão gênica de proteínas associadas à progressão do ciclo celular em HUVECs;
- Avaliar a capacidade de recuperação da proliferação de células HUVECs após remoção do PCIP.

4. Material e métodos

4.1 Local de estudo

Os ensaios deste estudo foram realizados no Laboratório de Tripanosomatídeos (LATRI) e Laboratório de Osteoimunologia e Imunologia dos Tumores, ambos pertencentes ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia. Experimentos também foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais (LabiTox), pertencente ao Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB) da UFU. Além destes, também contamos com a colaboração do Laboratório Especial de Ciclo Celular situado no Instituto Butantan (São Paulo).

4.2 Animais e ética

Camundongos BALB/c fêmeas (n=2) com seis a oito semanas de idade foram mantidos sob condições padrão de 12 h de luz e 12 h de escuro, em temperatura de $25\pm2^{\circ}\text{C}$, com ração e água *ad libitum*. A manutenção, manipulação e eutanásia dos animais respeitaram as diretrizes do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Todos os ensaios envolvendo o uso de animais foram realizados mediante aprovação do CEUA/UFU (Número protocolo 130/15).

4.3 Cultivo celular

Células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs) (CRL-1730), obtidas do “American Type Culture Collection” (ATCC, Manassas, VA, EUA), foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e suplementado com 2 mM de L-glutamina, 2 mM de piruvato de sódio, 1 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina, e mantidas em estufa 37°C e 5% CO_2 .

4.4 Síntese de pentacloropseudilin (PCIP)

PCIP foi sintetizado, como previamente descrito, por Martin *et al.* (2009) e gentilmente cedido para realização deste trabalho.

4.5 Viabilidade celular

A viabilidade de células HUVECs tratadas com PCIP foi avaliada pelo método colorimétrico MTT (*3-(4,5-dimetitiazol-2-il) -2,5-difenil-2H-tetrazólio*) e pelo ensaio com Rodamina 123 (sonda mitocondrial). As células foram plaqueadas ($3,0 \times 10^4$ células/poço) em placa de 96 poços. Após a adesão, as células foram tratadas com concentrações em diluição seriada (1:2) de PCIP (200 μM até 1,56 μM) por 24h, e mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Células tratadas com meio de cultura na ausência de PCIP foi usado como grupo controle e considerado como 100% de viabilidade. Após 24 h, as células foram incubadas com MTT (20 μL ; 5 mg/mL) por 3 h a 37 °C. Cristais de formazano resultantes da redução de MTT foram dissolvidos com a adição de 100 μL de PBS 1x contendo 10% de SDS e 0,01 M HCl (18 h, 37°C e 5% CO₂). A absorbância (570 nm) foi lida em um espectrofotômetro scanner multiplas (Thermo Scientific). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem, considerando como 100% de viabilidade a absorbância das células incubadas apenas com meio de cultura (grupo controle).

Adicionalmente, a viabilidade de células HUVECs tratadas com PCIP também foi avaliada utilizando Rodamina 123 (um corante verde fluorescente permeável a células e catiônico). Resumidamente, células HUVECs foram semeadas a uma densidade de $0,7 \times 10^5$ células/poço em microplacas de 24 poços e após adesão, as células foram incubadas com PCIP (50 μM) ou meio de cultura (grupo de controle) durante 24 h a 37°C e 5% de CO₂. Depois disso, as células foram coletadas, lavadas com PBS 1x e incubadas com Rodamina 123 (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS) durante 30 minutos a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, as amostras foram analisadas no FACSCantoII (BD) e os resultados foram obtidos utilizando o software FlowJo (versão 7.6.3).

4.6 Ensaio de angiogênese *in vitro*

O teste de formação de vasos em Matrigel foi realizado conforme previamente descrito (Hu *et al.*, 1995; Ache *et al.*, 2015), com modificações. Para verificar o impacto da inibição de Myo1c na formação de vasos, células HUVECs (5×10^5 células/poço) foram pré-incubadas com concentrações crescentes de PCIP (10, 25 e 50 μM) ou com meio de cultura (grupo controle) por 30 minutos a 37 °C e 5% de CO₂. Após o tratamento, as células foram semeadas em placa de 24 poços previamente revestidas com 50 μL de Matrigel (5,25 mg/mL) (Corning® Matrigel® Matrix, USA) e incubadas com meio suplementado com fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) (30 ng/mL) (Thermo Fisher Scientific, Brazil). Após 18h de incubação à 37°C e 5% CO₂, as células foram submetidas à um microscópio invertido e imagens varrendo toda a extensão dos poços foram adquiridas em um aumento de 20x. A partir das imagens obtidas, foi realizado a contagem do número de vasos formados (Teixeira *et al.*, 2015; Teixeira *et al.*, 2017).

4.7 Ensaio do anel aórtico de camundongo

Para corroborar com o ensaio de angiogênese *in vitro*, utilizamos um modelo de estudo de formação de vasos *ex vivo*, chamado de ensaio do anel aórtico de camundongo (Baker *et al.*, 2011; Gimenes *et al.*, 2017). Resumidamente, fragmentos aórticos foram removidos de camundongos fêmeas da linhagem Balb/c, cortados transversalmente (anéis aórticos) e lavados em PBS gelado suplementado com 1% penicilina-estreptomicina. Os anéis aórticos foram colocados em câmaras de cultura celular (Falcon™ Chambered Cell Culture Slides) previamente revistas com 50 μL de matrigel (5 mg/mL) (Corning® Matrigel® Matrix, USA) e incubados em meio RPMI suplementado com bFGF (10 ng/mL) por 24 h antes de serem tratados com PCIP (50 μM) ou meio de cultura (grupo controle). Após, esses anéis aórticos foram tratados com PCIP durante 7 dias, em intervalos de 2 dias. Posteriormente, imagens dos anéis aórticos foram adquiridas por meio de um microscópio ótico invertido (Nikon Eclipse TS100).

4.8 Proliferação celular

Células HUVECs foram semeadas a uma densidade de $1,0 \times 10^4$ células em microplacas de 24 poços. Após a adesão, as células foram incubadas com meio de cultura (10% SFB) ou PCIP (50 μ M) por 24, 48 e 72 h a 37 ° C. Após o tempo de tratamento, o meio de cultura foi removido e os poços lavados com PBS 1x. Em seguida, as células aderidas foram coletadas pelo uso de tripsina e contadas em câmara de Neubauer.

Adicionalmente, a proliferação de células HUVECs tratadas ou não com PCIP foi avaliada por meio do método de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Lopez *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2017). Resumidamente, HUVECs foram semeadas a uma densidade de $3,0 \times 10^4$ células/poço em placa de 96 poços. Após a adesão, as células foram cultivadas na presença de meio de cultura suplementado com 10% SFB e bFGF (30 ng/mL) na presença ou ausência de PCIP (50 μ M) por 24, 48 e 72 h a 37°C e 5% CO₂. Como controle negativo, as células foram cultivadas meio de cultura livre de SFB, bFGF e PCIP. Após os tempos de tratamento, as células foram incubadas com o reagente MTT e seguiu-se conforme metodologia previamente descrita no item 4.5.

Além disso, foi realizado o ensaio de recuperação da proliferação celular. Aqui, células HUVECs foram semeadas a uma densidade de $3,0 \times 10^4$ células/poço em microplacas de 96 poços. Após a adesão, as células foram incubadas com meio de cultura (10% SFB) ou PCIP (50 μ M) por 24 h. Depois disso, o tratamento com PCIP foi ou não removido e a proliferação celular foi analisada até 72 h por ensaio MTT como descrito anteriormente.

4.9 Avaliação da migração horizontal e vertical de células HUVECs

Para mensurar os efeitos da inibição de Myo1c na migração celular, ensaios de *wound-healing* e *transwell* foram realizados (Liang *et al.*, 2007; Yue *et al.*, 2010; Justus *et al.*, 2014). Células HUVECs ($0,7 \times 10^5$ células/poço) foram semeadas em placa de 24 poços e cultivadas até confluência de aproximadamente 80% a 37°C e 5% CO₂. Após, foi realizado o risco, com o auxílio de uma ponteira de 200 μ L, sobre a monocamada de células. Em seguida, os poços foram lavados com PBS 1x para a remoção das células do sobrenadante. As células foram cultivadas na ausência ou presença de PCIP (10, 25 e 50

μM). Para avaliação da migração celular horizontal, foram tiradas fotos no tempo zero ($t = 0\text{h}$) e com 24 h ($t = \Delta\text{h}$). Imagens foram capturadas através do uso de um microscópio invertido. A migração horizontal de células foi expressa como a porcentagem de fechamento da ferida (risco): $\% \text{ de migração horizontal} = [(A_{t=0\text{h}} - A_{t=\Delta\text{h}}) / A_{t=0\text{h}}] \times 100\%$. Onde, $A_{t=0\text{h}}$ é área do risco mensurada no tempo zero e $A_{t=\Delta\text{h}}$ é área do risco no tempo avaliado.

A migração vertical foi avaliada com o uso de transwell que apresenta uma membrana de policarbonato com poro de 8 μm (Chemicon Cell Invasion Assay Kit, EMD Millipore Corporation, Darmstadt, Germany). Células HUVECs ($0,7 \times 10^5$ células) foram incubadas ou não com PCIP (50 μM) e adicionadas na parte superior das câmaras de transwell, enquanto na parte inferior foi adicionado meio de cultura contendo 10% SFB (controle positivo de migração) ou meio de cultura sem SFB (controle negativo de migração). Após 24 h, células que migraram foram coradas com kit panótico de acordo com normas do fabricante, e imagens de toda membrana do transwell foram adquiridas. Foi feita a contagem de todas as células que migraram através da membrana em todas as situações experimentais abordadas.

4.10 Marcação de F-actina e quantificação da área celular

A marcação de F-actina e a medição da área celular foram determinadas como descrito anteriormente (Agley *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2012; Teixeira *et al.*, 2017). Para medir a área de cada célula, HUVECs foram plaqueadas a uma densidade de $0,5 \times 10^5$ células/lamínula em microplacas de 24 poços. Após a adesão, as células foram tratadas com diferentes concentrações de PCIP (10, 25 e 50 μM) ou meio de cultura (grupo controle) durante 24 h a 37 ° C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram fixadas com formaldeído 4% durante 1 h à temperatura ambiente e as lamínulas foram lavadas cuidadosamente três vezes com PBS 1x. As células fixadas foram incubadas com faloidina-TRITC (1:500) e TO-PRO-3 (1:500) diluídos em PGN-saponina a 0,01% durante 1 h para marcar a F-actina e núcleos celulares, respectivamente. As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro e as imagens foram capturadas usando um microscópio de fluorescência invertido (Zeiss Axiovert 200 M). As imagens digitais foram analisadas através de um software de microscopia de fluorescência confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha) e a área de cada célula ($n=100$ por situação

experimental) foi medida manualmente no software ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

4.11 Adesão celular e descolamento celular de HUVECs

Os ensaios de adesão celular e descolamento celular induzidos por PCIP foram avaliados de acordo com metodologias descritas (Lopes *et al.*, 2012; Baldo *et al.*, 2015). Previamente, microplacas de 96 poços foram revestidas com 50 µL de colágeno IV (10 µg/mL em ácido acético 0,1 M), fibronectina (5 µg/mL em PBS 1x), ou matrigel (10 µg/mL em PBS 1x) durante a noite a 4 ° C. Após, cada poço foi lavado duas vezes com PBS e bloqueado com 50 µL de BSA 0,1% em PBS durante 1 h à temperatura ambiente. Poços sem qualquer revestimento de componentes matriz extracelular foram utilizados como controle.

Para o experimento de inibição da adesão celular, HUVECs ($3,0 \times 10^4$ células/poço) foram pré-incubadas com PCIP (10, 25 e 50 µM) ou meio de cultura (grupo controle) por 30 minutos a 37 ° C e 5% CO₂. Subsequentemente, estas células foram adicionadas a uma placa de 96 poços previamente revestida ou não revestida com componentes da matriz extracelular. Após 3 h, as células destacadas (que não aderiram) foram removidas por duas lavagens cuidadosas com PBS 1x. As células aderidas foram quantificadas pelo ensaio MTT, como descrito anteriormente. Células incubadas apenas com meio de cultura foram consideradas como controle de 100% de adesão celular.

Para quantificar o descolamento celular induzido por PCIP, HUVECs ($3,0 \times 10^4$ células/poço) foram plaqueadas em placa de 96 poços previamente revestidas ou não revestidas. Após adesão, as células foram tratadas com meio de cultura na ausência (grupo controle) ou presença de diferentes concentrações de PCIP (10, 25 e 50 µM). Após 24 h, as células descoladas foram removidas por duas lavagens cuidadosas utilizando PBS 1x e o número de células remanescentes foi quantificado pelo ensaio MTT, como descrito acima. Para ambos os experimentos, a absorbância (570 nm) foi lida em um espectrofotômetro scanner multiplaços (Thermo Scientific). Para corroborar com os ensaios anteriores, células HUVECs foram semeadas a uma densidade de $0,25 \times 10^5$ células em microplacas de 24 poços. Após a adesão, as células foram incubadas com meio de cultura ou PCIP (50 µM) por 24 h a 37 ° C. Após o tratamento,

as células presentes no sobrenadante da cultura celular foram coletadas e contadas em câmara de Neubauer.

4.12 Expressão gênica

Para os experimentos de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), células HUVECs ($0,7 \times 10^5$ células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços. As células foram incubadas com meio de cultura (grupo controle) e PCIP (50 μ M) por 24 h. O RNA total foi extraído das células com o kit Maxwell® RSC simplyRNA Tissue Kit para células cultivadas (Promega, Fitchburg, WI, EUA) e um kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems) foi usado para transcrição reversa, de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações e a qualidade do RNA foram determinadas a 260/280 nm em espectrofotômetro NanoDrop 2000c UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific). As reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando o kit qPCR – Sybr Green Rox Plus - (LGC Biotecnologia) em sistema ABI 7300 (Applied Biosystems). O protocolo de ciclagem térmica a seguir, foi usado conforme recomendado pelo fabricante: 95 ° C por 2 minutos, 95 ° C por 5 segundos e 60 ° C por 10 segundos por 40 ciclos. Os ciclos foram seguidos por uma análise da curva de fusão a 95 ° C durante 15 segundos e a 60 ° C durante 1 min. Os dados obtidos foram analisados pelo SDS Software v1.4.1 (Applied Biosystems).

Os primers (ITGA2, ITGA3, ITGA4, ITGA5, ITGB1, ITGB3, ATM, CCNE1, CCND1, CDK2, CDK4, CDKN1A, CDKN2A, CDC25A, CHEK1, CHEK2, GAPDH) foram adquiridos da GO GENONE - HCAN-1® (Human Cancer Pathway Primer Library), Brasil. A normalização dos dados se deu pela utilização do GAPDH como gene endógeno/referência (housekeeping gene) e, em seguida, foram analisados por meio do método comparativo de ciclo limiar (C_T) para calcular as alterações na expressão de dobragem (fold change) nos grupos tratados com PCIP em comparação com o grupo controle (não tratado), onde $\Delta C_T = C_T$ do gene de interesse menos C_T de GAPDH e $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ dos grupos tratados menos a média do ΔC_T dos grupos tratados com meio de cultura (calibrador). As alterações na expressão gênica para os grupos tratados foram então calculadas como $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Todos os experimentos relativos a qPCR foram realizados em triplicadas biológicas e técnicas.

4.13 Citometria de fluxo para análise da expressão proteica

A expressão de $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 1$ e $\alpha V\beta 3$ na superfície da membrana de HUVECs incubadas com meio de cultura (grupo controle) ou PCIP (50 μ M) por 24 h foi analisada por citometria de fluxo. Células HUVECs foram cuidadosamente removidas com tripsina, lavadas com PBS 1x e bloqueadas com BSA 0,5% em PBS 1x por 20 minutos a 4 ° C, e centrifugadas. A expressão de diferentes moléculas foi analisada pela incubação das células com anticorpos monoclonais conjugados com fluoresceína: anti- $\alpha 2$ (CD49b), anti- $\beta 1$ (CD29), anti- $\alpha V\beta 3$ (CD51/CD61) e anti- $\alpha 5$ (CD49e) (Ambriex, Brazil) por 30 minutos no escuro em temperatura ambiente. A citometria de fluxo das amostras em triplicata (10^4 eventos/amostra) foi realizada com FACSCantoII (BD) e os resultados obtidos foram analisados por meio do software FlowJo (versão 7.6.3). Os dados foram expressos como mediana da intensidade de fluorescência (MFI).

Para investigar o impacto da inibição de Myo1c no acúmulo e distribuição de integrinas em células HUVECs, foram realizados experimentos de imunofluorescência usando marcadores para integrinas (os mesmos mencionados acima) e TO-PRO-3 para marcação do núcleo. Em resumo, células HUVECs ($0,5 \times 10^5$ células/lamínulas) foram semeadas em microplacas de 24 poços e após a adesão foram então incubadas ou não com PCIP (50 μ M) durante 24 h. Após sucessivas lavagens, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 1 h em temperatura ambiente e lavadas três vezes com PBS 1x. Em seguida, as lamínulas foram incubadas com anticorpos anti-humanos monoclonais conjugados com fluoresceína (diluídos 1:50 em solução de PGN-saponina 0,01%) e TO-PRO-3 (diluído 1:500 em PGN-saponina 0,01%) por 1h no escuro à temperatura ambiente. As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro previamente cobertas com *phenylenediamine* (PPD) e as amostras foram analisadas por microscopia de fluorescência confocal utilizando um microscópio invertido (Zeiss Axiovert 200 M). As imagens digitais foram analisadas usando software de microscopia de fluorescência confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha),

4.14 Análise de dano no DNA pelo método de TUNEL

Para análise *in situ* do DNA, foi utilizado o método de marcação de “nicks” (quebras de fitas simples) por dUTP e *deoxinucleotidil terminal transferase* (TUNEL), através do DeadEnd Fluorometric TUNEL System kit (Promega). Resumidamente,

células HUVECs foram semeadas a uma densidade de $0,3 \times 10^5$ células/lamínula em microplacas de 24 poços. Após adesão, as células foram tratadas com meio de cultura na ausência ou presença de 50 μM de PCIP por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂. As lamínulas foram lavadas com PBS 1x e fixadas usando paraformaldeído 1% durante 15 minutos. As células fixadas foram lavadas com PBS 1x e permeabilizadas por adição de Triton X-100 0,1% durante 5 minutos a 26 °C e o ensaio TUNEL foi realizado de acordo com metodologia sugerida pelo fabricante. O meio de montagem VECTASHIELD® com DAPI (DAPI - Vector Labs) foi utilizado como uma solução de montagem anti-fade e para marcar o DNA nuclear. Para controle negativo, a reação de TUNEL foi feita sem enzima TdT. Para controle positivo, as células do controle foram pré-tratadas com 1 unidade/mL de DNase I por 10 minutos. As células foram analisadas usando um microscópio fluorescente Olympus Bx51 (aumento 100x) acoplado a uma lâmpada EXFO Xcite série 120Q e uma câmera digital Olympus XM10 com software de controlador de câmera Olympus Cell F (Olympus, Japão). As imagens de fluorescência foram obtidas usando o software Olympus - Cell F e o número de células TUNEL-positivas contadas e comparadas entre os grupos controles (da Silva et al., 2016).

4.15 Ensaio de apoptose

O ensaio de apoptose foi realizado pela marcação com anexina-V conjugada a FITC e iodeto de propídio (PI) através do kit de detecção de apoptose (BD Biosciences, Brazil), de acordo com as instruções do fabricante. HUVECs ($0,7 \times 10^5$ células/poço) foram plaqueadas em microplacas de 24 poços a 37 °C e 5% de CO₂. Após a adesão, as células foram incubadas com meio de cultura na ausência (células controle) ou presença de PCIP (50 μM). Após 24 h, as células foram cuidadosamente obtidas utilizando tripsina, lavadas com PBS 1x e marcadas com anexina V e PI diluídos em tampão de ligação 1X durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, as amostras foram examinadas por citometria de fluxo em um FACSCantoII (BD) e os dados foram obtidos usando o software FlowJo (versão 7.6.3).

4.16 Análise do ciclo celular

O ciclo celular foi analisado por quantificação do teor de DNA, como previamente descrito (Crissman e Steinkamp, 1973; Krishan, 1975; Teixeira *et al.*,

2017). Resumidamente, células HUVECs foram plaqueadas a uma densidade de $0,5 \times 10^5$ células/poço em placa de 12 poços e, após a adesão, as células foram incubadas com PCIP (50 μ M) ou meio de cultura (grupo controle) por 24 horas a 37 ° C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram colhidas, lavadas com PBS 1x e fixadas em etanol 70% *overnight* à 4°C. Após, células HUVECs foram centrifugadas (2000 RPM por 5 minutos) e ressuspensas em solução de RNase A (100 μ g/mL) e iodeto de propídio (PI) (10 μ g/mL) por 35 minutos a 37°C no escuro. O ciclo celular foi analisado quantificando o conteúdo de DNA em um FACSCantoII (BD) e os dados foram obtidos através do software FlowJo (FlowJo v. 7.6.3; Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

4.17 Normas de biossegurança

Todos os procedimentos envolvendo manuseio de amostras biológicas e reagentes, bem como a utilização de equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança.

4.18 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Todos os dados foram primeiro verificados para distribuição normal. Diferenças significativas foram determinadas por meio dos testes *Student's t-test*, *Mann-Whitney (two-sided)*, *one-way* ou *two-way ANOVA* e testes de múltiplas comparações: *Turkey's* (amostras paramétricas) ou *Dunn's* (amostras não paramétricas), de acordo com o desenho experimental (GraphPad Prism software, versão 6.01). Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando P <0,05.

5. Resultados e discussão

5.1 A inibição da Myo1c pelo PCIP promove uma diminuição na formação de vasos sanguíneos

A angiogênese é um processo complexo multifacetado caracterizado por numerosas cascatas de transdução de sinal intracelular que regulam a transmissão de um sinal ou carga através da célula, o que resulta na criação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos preexistentes (Welti *et al.*, 2013). Antes de investigarmos o papel da miosina 1c (Myo1c) na angiogênese, verificamos a viabilidade das células endoteliais HUVECs tratadas com diferentes concentrações de PCIP. Os nossos resultados mostraram que HUVECs tratadas com PCIP e alteraram a viabilidade celular significativamente apenas na concentração de 200 μ M após 24 h de tratamento (**Figura 2A**). Para confirmar o efeito não citotóxico do PCIP, foi realizado o ensaio com rodamina 123. Nossos resultados mostraram que o tratamento com PCIP (50 μ M) não alterou a viabilidade celular (**Figura 2B**). Diante disso, para avaliar a atividade da Myo1c na angiogênese, tratamos as células HUVECs com concentrações não tóxicas do composto PCIP.

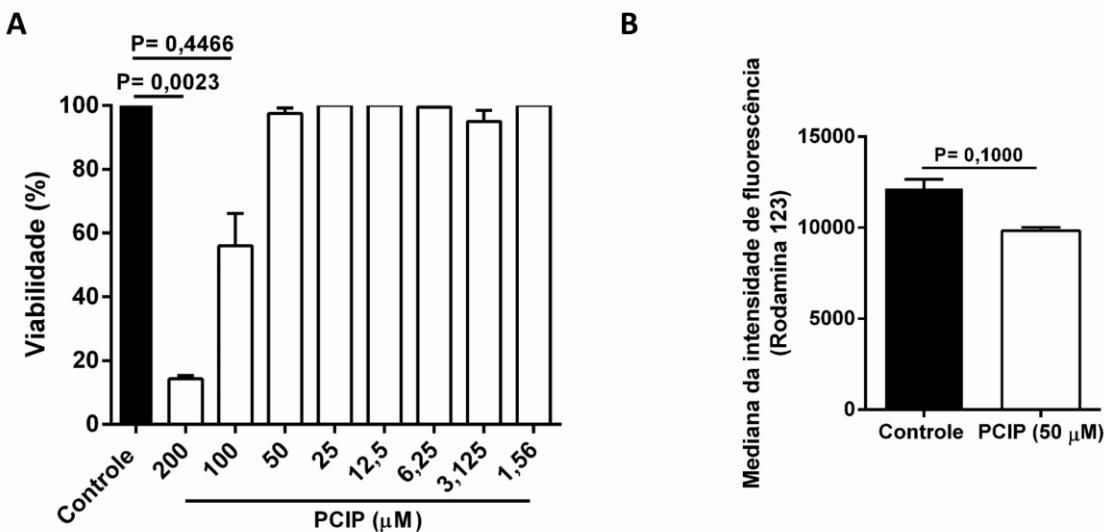


Figura 2 – Viabilidade de células HUVECs tratadas com PCIP. (A) Células HUVECs foram tratadas com diferentes concentrações (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,56 μ M) de PCIP e exibiram alteração significativa na viabilidade celular apenas na concentração de 200 μ M após 24h de tratamento. (B) A confirmação da concentração não tóxica de PCIP (50 μ M) visto pelo teste de MTT, foi confirmada pelo ensaio de Rodamina 123, e observamos que não houve alteração da viabilidade celular, quando comparado com o controle. Diferenças significativas foram determinadas por one-way ANOVA e Tukey's multiple comparisons test (A) e Student's t-test e Mann-Whitney test (B) (GraphPad Prism software, versão 6.01). As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Em seguida, a fim de investigar o impacto da inibição da Myo1c na formação de vasos, HUVECs foram pré-incubadas com PCIP (50 μ M) e semeadas em placas de 24 poços previamente revestidas com matrigel. A formação de estruturas semelhantes a capilar em matrigel previamente estimulado com bFGF foi fortemente inibida pelo tratamento com PCIP, mostrando uma redução significativa no número de vasos formados (**Figura 3A, B**). Além disso, a angiogênese *ex vivo* foi analisada através do ensaio do anel aórtico. Fragmentos aórticos foram removidos de camundongos e colocados em contato com matrigel para a formação de vasos. Contudo, o tratamento com PCIP a 50 μ M durante 7 dias foi capaz de inibir o brotamento de vasos alongados a partir do anel aórtico em comparação com o controle (grupo não tratado), no qual é possível observar a presença dos vasos (**Figura 3C**).

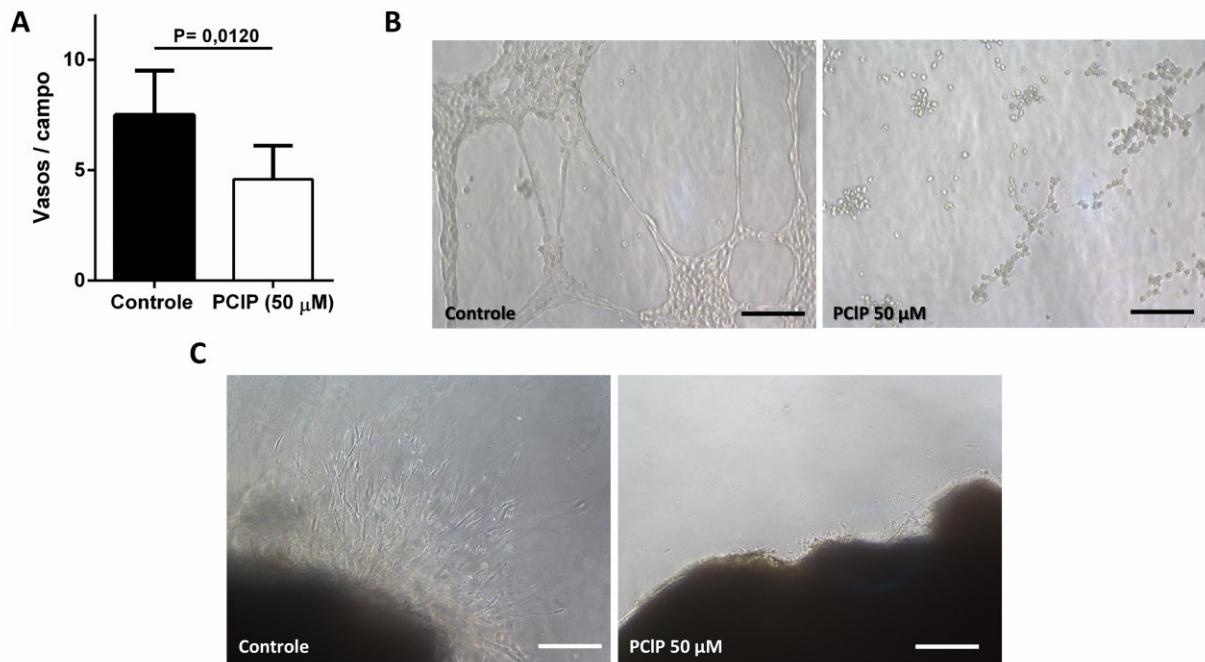


Figura 3 – A inibição da Myo1c promoveu uma redução na formação de vasos *in vitro* e *ex vivo*. (A) HUVECs foram pré-incubadas com PCIP (50 μ M) e semeadas em placas de 24 poços que tinham sido previamente revestidas com matrigel. O bloqueio da Myo1c pelo PCIP promoveu uma diminuição no número de vasos sanguíneo quando comparado com o grupo controle (não tratado). (B) Imagens representativas do contraste de fase destacando a morfologia dos vasos no ensaio de formação de vasos no matrigel são demostradas. (C) O tratamento com PCIP inibiu o surgimento de vasos a partir do anel aórtico *ex vivo* em comparação com o controle. Diferenças significativas foram determinadas por Student's t-test e Mann-Whitney test (A) (GraphPad Prism software, versão 6.01). Diferenças foram consideradas significantes quando $P < 0,05$. Barras: 20 μ m.

As etapas básicas da angiogênese incluem degradação enzimática da membrana basal do capilar, proliferação de células endoteliais (ECs), migração dirigida de ECs, tubulogênese (formação de tubo de EC), fusão de vasos, remoção de vasos e estabilização de pericitos. Nossos resultados mostraram que a inibição de Myo1c culminou em uma redução significativa na formação de vasos. Nesse sentido, uma questão intrigante foi levantada: qual seria o impacto da inibição de Myo1c mediada pelo PCIP nas etapas básicas do processo de angiogênese? Assim, objetivamos avaliar o papel da Myo1c na proliferação e migração de ECs.

Em primeiro lugar, verificamos o impacto da Myo1c na proliferação das células HUVECs. A curva de crescimento celular mostrou uma diminuição em todos os tempos de tratamento com PCIP (**Figura 4A**). Além disso, o ensaio de proliferação por MTT demonstrou que PCIP inibiu a proliferação celular em 24, 48 e 72 h em todas as situações, mesmo na presença de fatores pró-proliferativos (SFB - soro fetal bovino;

bFGF – fator de crescimento de fibroblasto básico) (Figura 4B-E). Estes resultados mostram que a Myo1c pode estar diretamente envolvida com a proliferação de células endoteliais.

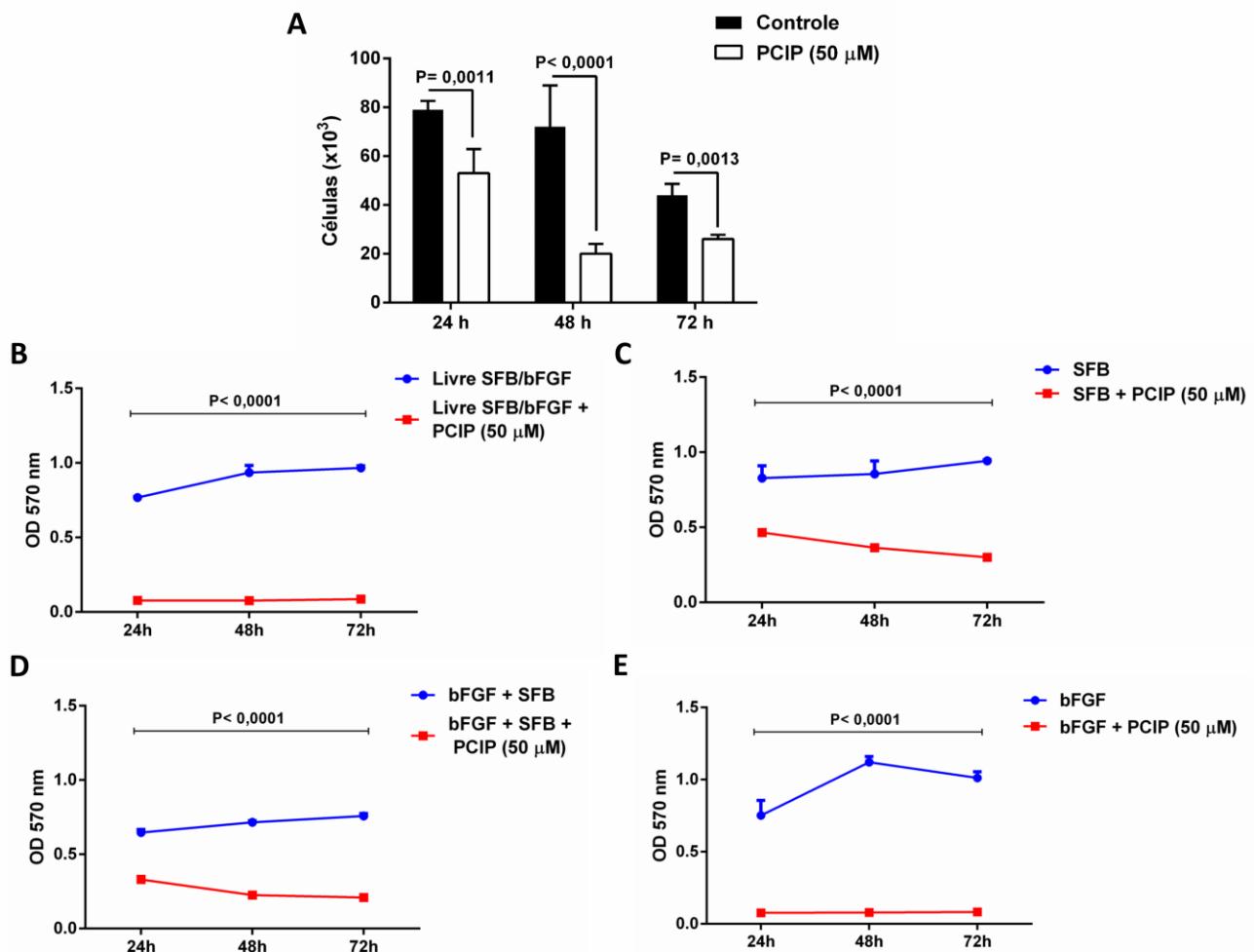


Figura 4 - O bloqueio da atividade da Myo1c pelo PCIP inibiu a proliferação de ECs. (A) A curva de crescimento de células HUVECs na presença de PCIP (50 μ M) por 24, 48 e 72 h mostrou redução no número de células em todos os tempos analisados. (B-E) O tratamento com PCIP inibiu a proliferação de ECs ao longo dos tempos (24, 48 e 72 h) em todas as situações, mesmo na presença de fatores pró-proliferativos (SFB - soro fetal bovino; bFGF - fator de crescimento de fibroblasto básico). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas foram determinadas usando two-way ANOVA e Sidak's multiple comparisons test, comparando o grupo controle (ausência de PCIP) e o grupo tratado (presença de PCIP) (A-E) (GraphPad Prism software, versão 6.01). Diferenças foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

Além disso, para medir os efeitos da inibição da Myo1c na migração celular, os ensaios de *wound healing* e *transwell* foram realizados. A migração horizontal das células foi observada 24 h após o risco/ferimento. A porcentagem de fechamento do risco no grupo tratado com diferentes concentrações do PCIP (10, 25 e 50 μ M) foi de cerca de 40%, enquanto a porcentagem no grupo controle (células não tratadas) foi de 100% (**Figura 5A, B**). A fim de obter informações sobre o efeito direto da inibição da Myo1c sobre a migração de ECs, abordamos a capacidade do PCIP em inibir a migração vertical de HUVECs através de uma membrana de policarbonato presente em um sistema de *transwell*. Nossos resultados mostraram que o tratamento com o PCIP foi capaz de inibir a migração vertical das células HUVECs (**Figura 6A, B**).

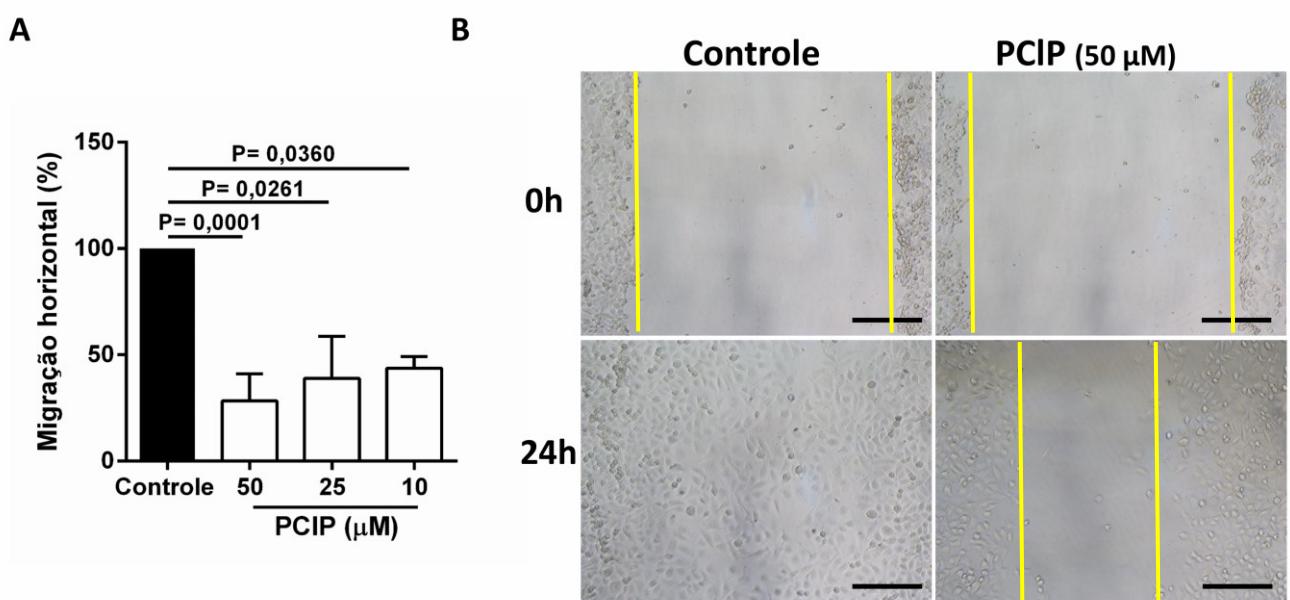


Figura 5 - O tratamento com PCIP promoveu redução significativa na migração horizontal de células HUVECs. (A) Observamos que a porcentagem de migração no grupo tratado com diferentes concentrações do PCIP (10, 25 e 50 μ M) foi de cerca de 40%, enquanto a porcentagem no grupo controle (células não tratadas) foi de 100%. (B) Imagens representativas demonstram o impacto da inibição de Myo1c durante a migração horizontal avaliada pela técnica *wound healing*. Diferenças significativas foram determinadas por one-way ANOVA e Tukey's multiple comparisons test (GraphPad Prism software, versão 6.01). As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Barras: 20 μ m.

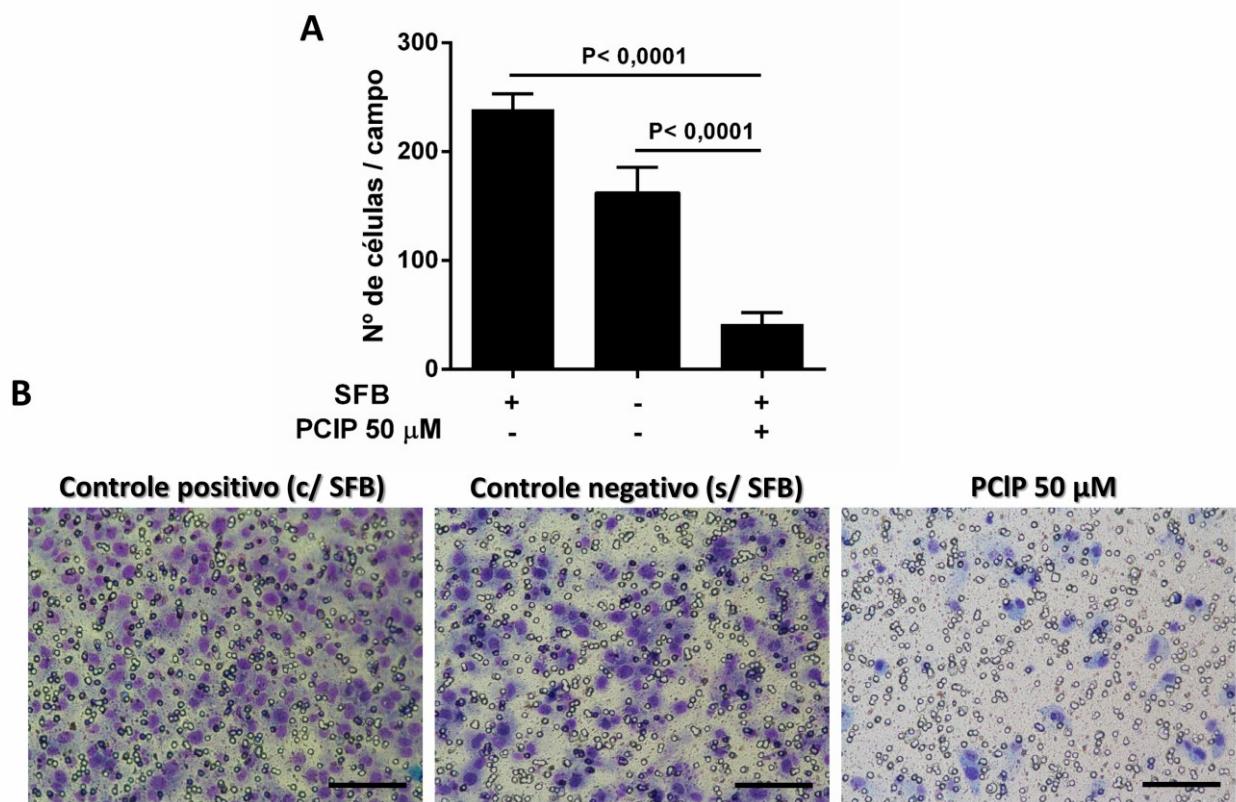


Figura 6 - O tratamento com PCIP promoveu redução significativa na migração vertical de células HUVECs. (A) Células HUVECs foram incubadas ou não com PCIP (50 μ M) e adicionadas na parte superior das câmaras de transwell e a capacidade migratória dessas células através de uma membrana de policarbonato presente em um sistema *transwell* foi avaliada após 24 h. Observamos que a inibição da Myo1c pelo PCIP desencadeou uma redução significativa na migração vertical das células HUVECs. (B) Imagens representativas do ensaio de migração por *transwell*. **Controle positivo de migração:** parte inferior do *transwell* foi adicionado meio de cultura contendo 10% SFB (composto quimioatraente); **Controle negativo de migração:** parte inferior do *transwell* foi adicionado meio de cultura sem SFB; **Tratamento:** células incubadas com PCIP e na câmara inferior do *transwell* continha meio de cultura 10% SFB. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas foram determinadas pelo one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test (GraphPad Prism software, versão 6.01). As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Barras: 20 μ m.

A actina é o maior componente do citoesqueleto das células endoteliais e orquestra várias etapas durante a formação de vasos. Dessa forma, o contínuo remodelamento dependente do citoesqueleto é essencial para a migração celular (Lamalice *et al.*, 2007). Para avaliar a influência da Myo1c no citoesqueleto de actina de ECs, células HUVECs foram tratadas com PCIP (10, 25 e 50 μ M) ou meio de cultura

(grupo controle) por 24 h e o padrão do citoesqueleto de actina foi analisado. Células HUVECs tratadas com PCIP apresentaram uma morfologia do citoesqueleto de actina nitidamente diferente, em comparação com as células não tratadas. As células do grupo controle se apresentaram de forma espalhadas e exibiram fibras de estresse tipicamente longas e grossas, alinhadas ao longo do eixo longitudinal da célula. Em contraste, após o tratamento com PCIP ocorreu uma mudança significativa na forma da célula, as quais apresentaram feixes finos e curtos de filamentos de actina com diminuição na dispersão e retração significativa na área celular (**Figura 7A, B**).

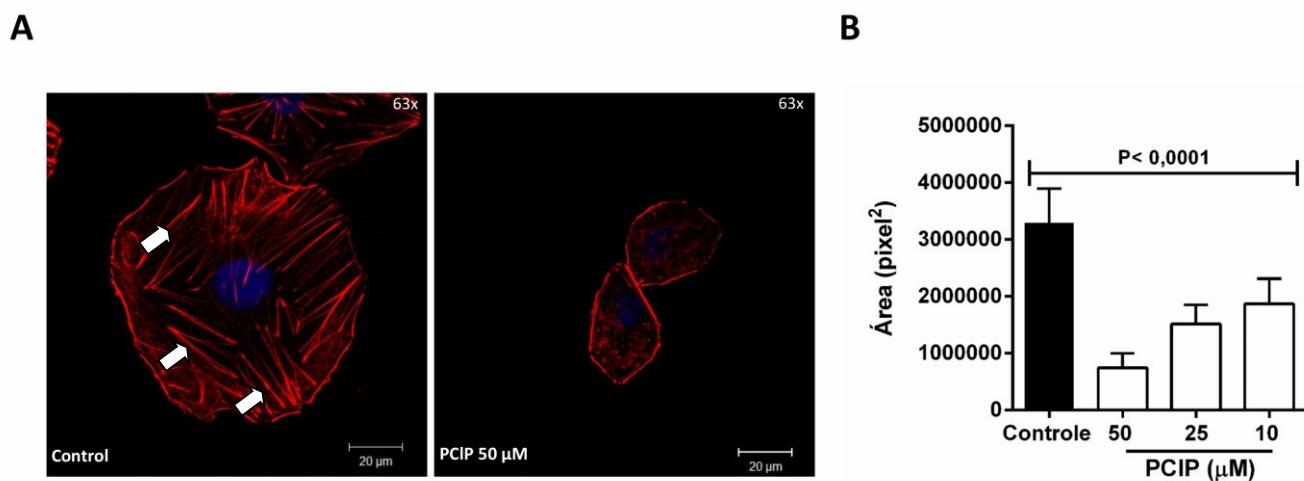


Figura 7 - A inibição da atividade da Myo1c alterou o padrão do citoesqueleto de actina e promoveu retração na área de ECs. (A) Imagens representativas destacam as diferenças na morfologia do citoesqueleto de actina. Enquanto as células HUVECs tratadas com PCIP exibiram feixes finos e curtos de filamentos de actina com diminuição na dispersão e retração celular, as células do grupo controle apresentaram fibras de estresse tipicamente longas e grossas alinhadas ao longo do eixo longitudinal da célula. (B) O tratamento com PCIP promoveu uma retração significativa do citoesqueleto de actina (diminuição na área celular) nas HUVECs em comparação ao grupo controle (células não tratadas). Diferenças significativas foram determinadas pelo one-way ANOVA e Tukey's multiple comparisons test, comparando o grupo controle (não tratado) com os grupos tratados (50, 25 e 10 μ M) (GraphPad Prism software, versão 6.01). As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. As imagens foram analisadas por microscópio de fluorescência confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha). Barras: 20 μ m. Aumento de 63x. TO-PRO-3: marcação de núcleo celular em azul. Faloidina-TRITC: marcação de F-actina em vermelho. Setas em branco indicam as fibras de estresse.

De fato, o constante remodelamento do citoesqueleto de actina em filopódios, lamelipódios e fibras de estresse são essenciais para conduzir as diversas etapas da motilidade de células endoteliais (Lamalice *et al.*, 2007). Nesse sentido, a Myo1c tem sido amplamente relacionada à regulação da dinâmica do citoesqueleto de actina, sugerindo seu papel crucial na agiogênese (Bond *et al.*, 2013). Bose e colaboradores (2002) (Bose *et al.*, 2002) demonstraram que a Myo1c está envolvida no rearranjo dinâmico da rede de actina cortical necessária para o tráfego intracelular de vesículas contendo o transportador de glicose do tipo 4 (GLUT4) em adipócitos. Além disso, Diefenbach e colaboradores (2002) (Diefenbach *et al.*, 2002) observaram retenção de Myo1c em lamelipódios, o que foi responsável por promover um aumento da protrusão lamelipodial em células móveis.

Além disso, foi demonstrado que a Myo1c também está envolvida no rearranjo do citoesqueleto de actina dentro dos lamelipódios e filopódios de células B (Maravillas-Montero *et al.*, 2011). A literatura científica demonstra que a Myo1c desempenha um papel crítico na regulação de uma complexa série de eventos de sinalização celular para moldar as mudanças que ocorrem durante a migração celular. Demonstramos que a inibição da função da Myo1c exibida pelo PCIP nas ECs é responsável por alterar a morfologia celular, o padrão do citoesqueleto de actina e interferir na migração horizontal e vertical, evidenciando seu papel durante a motilidade celular nas ECs. Interessantemente, nossos resultados estão de acordo com Brandstaetter *et al.* (2012) (Brandstaetter *et al.*, 2012), que demonstraram que células *knockdown* para Myo1c tiveram um impacto importante na distribuição e migração celular.

A polimerização da actina dirige a locomoção celular pela adição de subunidades globulares monoméricas (G-actina) na extremidade “farpada” dos filamentos de actina (F-actina) (Pollard e Borisy, 2003). Sugerimos que a inibição da função da Myo1c possa modular o transporte de G-actina durante a migração de ECs, o que pode interferir na taxa de polimerização do citoesqueleto de actina. Essa hipótese é corroborada por Fan e colaboradores (2012) (Fan *et al.*, 2012), que demonstraram que o domínio “cauda” de ligação de carga da Myo1c interage com a G-actina, e o domínio motor é necessário para o transporte. Esses dados foram confirmados pelos autores, onde demonstraram que o silenciamento do gene MYO1C comprometeu a entrega de G-actina e afetou a motilidade celular. Além disso, Chinthalapudi e colegas (2011) (Chinthalapudi *et al.*, 2011), demonstraram que a ligação/interação do PCIP à Myo1c

reduz a afinidade desta miosina pela F-actina. Assim, a inibição da migração celular desencadeada pelo bloqueio da atividade da Myo1c pelo PCIP pode ser parcialmente causada por uma interferência direta na interação Myo1c/F-actina e no transporte de G-actina nas ECs.

Hipóteses adicionais e não excludentes para explicar o impacto da Myo1c na angiogênese podem estar relacionadas à ativação de e兹rina. Ezrina é uma proteína da família e兹rina, radixina, moesina (ERM) envolvida na adesão, migração celular, angiogênese e atua como um ligante entre a membrana plasmática e o citoesqueleto de actina cortical (Bonilha, 2007; Brambilla e Fais, 2009; Zhao *et al.*, 2016). A característica marcante desta ligação é a ativação da e兹rina pela ligação do fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) (Shabardina *et al.*, 2016). Sabe-se que a Myo1c existe como monômero que contém uma estrutura similar de três partes encontrada na maioria das proteínas miosinas: um domínio motor N-terminal que se liga à actina e hidrolisa o ATP; uma região de “pescoço” (braço de alavaca) que consiste em vários motivos de IQ de ligação a calmodulina (CaM); e um domínio de homologia 1 (TH1) C-terminal com um domínio de homologia de pleckstrina (PH) capaz de se ligar a lipídeos de membrana tais como PIP2 (Adams e Pollard, 1989; Hayden *et al.*, 1990; Hokanson *et al.*, 2006; Hokanson e Ostap, 2006). Nesse sentido, hipotetizamos que a inibição alostérica causada pelo PCIP promova pequenas alterações conformacionais na Myo1c, o que prejudica a interação do domínio da Myo1c capaz de se ligar ao PIP2, comprometendo a ativação da e兹rina e inibindo a formação de vasos sanguíneos.

5.2 Bloqueio da atividade da Myo1c interfere em vias relacionadas com o tráfego intracelular de integrinas

A sinalização célula-célula e célula-matriz, comunicação entre sítios de adesão e migração celular são importantes eventos na arquitetura geral e manutenção da angiogênese (Smith *et al.*, 2016). Nossos resultados demonstraram que a Myo1c está envolvida em etapas básicas da formação de vasos. A fim de corroborar com esses achados, propusemos avaliar o papel da Myo1c na adesão celular.

Para o ensaio de inibição da adesão celular, células HUVECs foram pré-incubadas com diferentes concentrações de PCIP ou meio de cultura (grupo controle) e estas células foram semeadas em microplacas previamente revestidas ou não com diferentes componentes da matriz extracelular (ECM). Os dados mostram que a inibição

de Myo1c pelo PCIP (25 e 50 μ M) reduziu a adesão celular nos diferentes componentes da ECM avaliados, nomeados por colágeno IV, fibronectina e matrigel, bem como no grupo sem substrato/revestimento (**Figura 8**). Em seguida, avaliamos o impacto da inibição da Myo1c na promoção do descolamento celular. Células HUVECs foram plaqueadas em uma placa previamente revestida ou não com componentes da ECM. Após adesão, as células foram tratadas ou não com PCIP. Células não aderidas (presentes no sobrenadante) foram removidas após o tempo de tratamento e as células aderidas foram coradas por ensaio de MTT. Observamos um descolamento celular significativo nas maiores concentrações de PCIP no colágeno IV, fibronectina e matrigel (**Figura 9A**). Esta atividade foi confirmada quando demonstramos que o tratamento com PCIP promoveu um aumento significativo no número de células presentes no sobrenadante (**Figura 9B**).

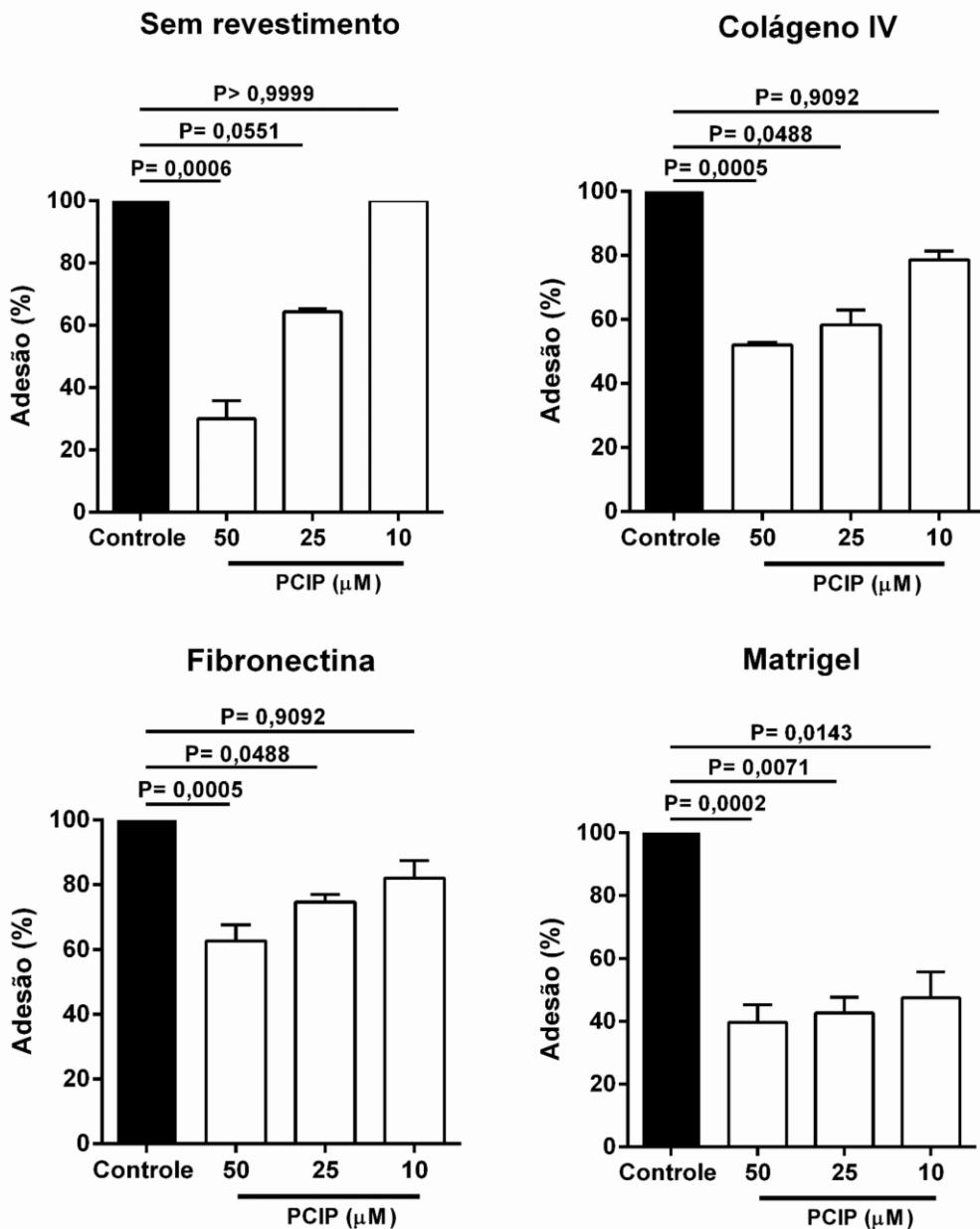


Figura 8 - A inibição da Myo1c prejudica a adesão celular. Para realização do ensaio de inibição da adesão celular, HUVECs foram ou não pré-incubadas com o PCIP e semeadas em microplacas revestidas ou não com componentes da ECM por 3 h. Após o tempo de adesão, os poços foram lavados e as células aderidas foram incubadas com MTT. De forma geral, observamos que o tratamento com PCIP (25 e 50 μM) foi capaz de reduzir a adesão celular nos diferentes grupos: colágeno IV, fibronectina, matrikel e controle não revestido (sem substrato). Em todas as situações, as células incubadas apenas com meio de cultura (grupo controle) foram consideradas como 100% de adesão celular. Diferenças significativas foram determinadas usando one-way ANOVA e Tukey's multiple comparisons test (GraphPad Prism software, versão 6.01). Diferenças foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

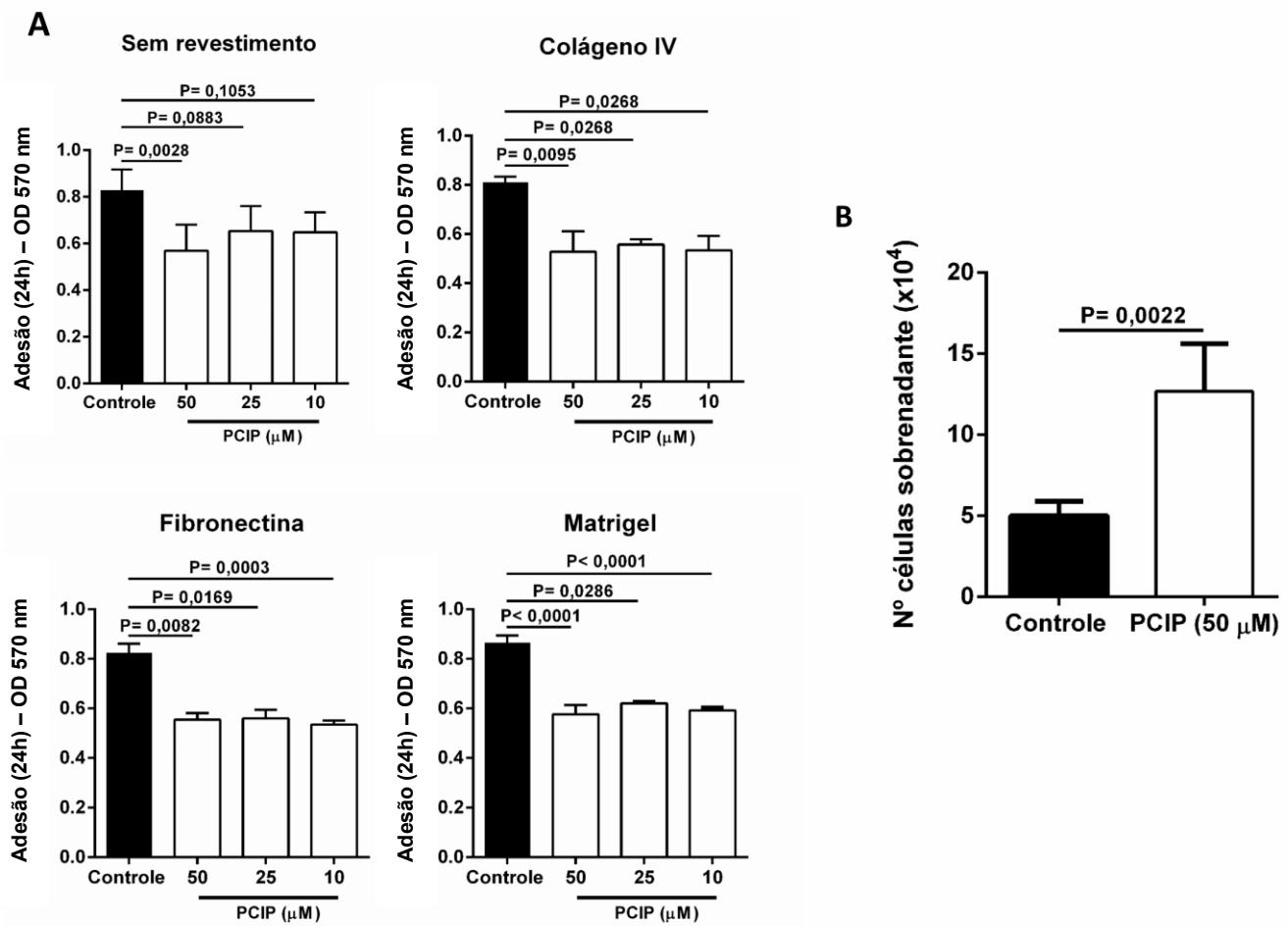


Figura 9 - A inibição da Myo1c promove descolamento celular. Para realização deste ensaio, células HUVECs foram semeadas em microplacas revestidas ou não com componentes da ECM. Após a adesão, as células foram ou não tratadas com diferentes concentrações de PCIP por 24 h, os poços lavados com PBS 1x e as células aderidas foram incubadas com MTT. (A) Todas as concentrações de PCIP utilizadas promoveram o descolamento de células HUVECs em colágeno IV, fibronectina, matrigel e no controle sem substrato (sem revestimento). (B) A quantificação do número de células, através de câmara de Neubauer, presentes no sobrenadante dos poços (sem revestimento) tratados ou não com PCIP (50 μM), demonstrou que o tratamento levou à um aumento significativo no número de células descoladas/desaderidas. Diferenças significativas foram determinadas usando one-way ANOVA e Tukey's multiple comparisons test (A) e Student's t-test e Mann-Whitney test (B) (GraphPad Prism software, versão 6.01). Diferenças foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

A matriz extracelular (ECM) é uma rede macromolecular tridimensional não celular. A ECM regula diferentes processos celulares, incluindo crescimento, migração, diferenciação, sobrevivência, homeostase e morfogênese. A ECM consiste em uma grande variedade de macromoléculas da matriz, como proteínas formadoras de fibras, como colágenos, elastina, fibronectina (FN), lamininas, glicoproteínas, proteoglicanos (PGs) e glicosaminoglicanos (GAGs). As células interagem com ECM através de seus receptores de superfície, como integrinas, receptores de domínio de discoidina (DDRs), PGs de superfície celular e outros receptores de adesão celular (Frantz *et al.*, 2010; Clause e Barker, 2013), e através dessas interações é que etapas fundamentais da angiogênese ocorrem, como a adesão, proliferação e migração celular. Nesse sentido, hipotetizamos que a inibição da adesão celular e descolamento celular desencadeado pelo bloqueio da Myo1c esteja relacionado ao tráfego de moléculas de adesão à superfície das ECs. Para testar essa hipótese, avaliamos a expressão gênica e proteica de integrinas.

Ao analisar a expressão relativa de mRNA de genes associados com a expressão de integrinas, observamos que o tratamento com PCIP foi capaz de promover uma regulação positiva das integrinas ITGA2, ITGA3, ITGB1 e uma modulação negativa de ITGA4, em comparação com o grupo controle (células não tratadas). A ITGA5 não foi modulada pelo tratamento com PCIP (**Figura 10A**). Para suportar esses achados, avaliamos por citometria de fluxo a presença de integrinas na membrana plasmática de ECs. Para isso, células HUVECs tratadas ou não com PCIP foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-integrinas. Nossos dados demonstraram que a inibição da Myo1c pelo PCIP promoveu uma redução significativa na intensidade da mediana de fluorescência das integrinas $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 1$ e $\alpha V\beta 3$, o que indica uma diminuição da presença destas integrinas na superfície da membrana das HUVECs (**Figura 10B**).

Caracteristicamente, células se espalham sobre a matriz extracelular por estender protrusões da membrana, como filopódios e lamelipódios e aderem o seu entorno em sítios de contato, chamados de adesões focais. Os complexos de adesão focal são compostos por integrinas, proteínas quinases — como a quinase de adesão focal (FAK, também conhecida como PTK2) e SRC — proteínas adaptadoras, como Shc, intermediários de sinalização, como GTPases da família Rho, proteínas do citoesqueleto de ligação a actina e outras proteínas (Mitra *et al.*, 2005; Mitra e Schlaepfer, 2006). As

integrinas são uma extensa família de receptores de adesão celular compostos por subunidades α e β que formam 24 heterodímeros e medeiam a adesão celular e a interação com a matriz extracelular (Hynes, 2002). Cada subunidade da integrina consiste em um domínio extracelular, uma única região transmembrana e uma região citoplasmática curta, que juntos promovem a fixação celular e migração na ECM circundante (Plow *et al.*, 2000; Takada *et al.*, 2007).

Propomos que a inibição da função da Myo1c promoveu uma interferência no tráfego de componentes necessários para as adesões focais na superfície das ECs, levando à inibição da adesão celular e ao descolamento das células. Nossos dados são corroborados por Arif *et al.* (2011) (Arif *et al.*, 2011), que demonstraram que o *knockdown* para Myo1c culminou na redistribuição de sítios de adesões focais, bem como na redução da velocidade de migração de células migratórias.

Nossos resultados mostraram que o tratamento com PCIP promoveu um aumento na expressão de genes de integrinas. Interessantemente, encontramos uma diminuição significativa da presença das mesmas integrinas na superfície da membrana plasmática de células HUVECs quando sofreram inibição da atividade da Myo1c pelo PCIP. Somado à isto, demonstramos retenção e acúmulo das integrinas $\alpha 2$ e $\beta 1$ no citoplasma de HUVECs tratadas com PCIP. Em contraste, o grupo controle (células não tratadas) exibiu uma distribuição homogênea das mesmas integrinas na superfície celular (**Figura 10C, D**). Desse modo, sugerimos que diante da inibição da Myo1c, as ECs promovam uma modulação positiva na expressão dos genes de integrinas em resposta à uma redução da presença de integrinas na superfície celular. No entanto, a inibição da Myo1c pelo PCIP prejudicou/comprometeu o tráfego dessas integrinas para a membrana plasmática, promovendo seu acúmulo intracelular. Em resumo, nossos achados indicam um claro papel da Myo1c como um regulador das vias de sinalização baseadas em integrinas, destacando o envolvimento da Myo1c em vias chaves na angiogênese.

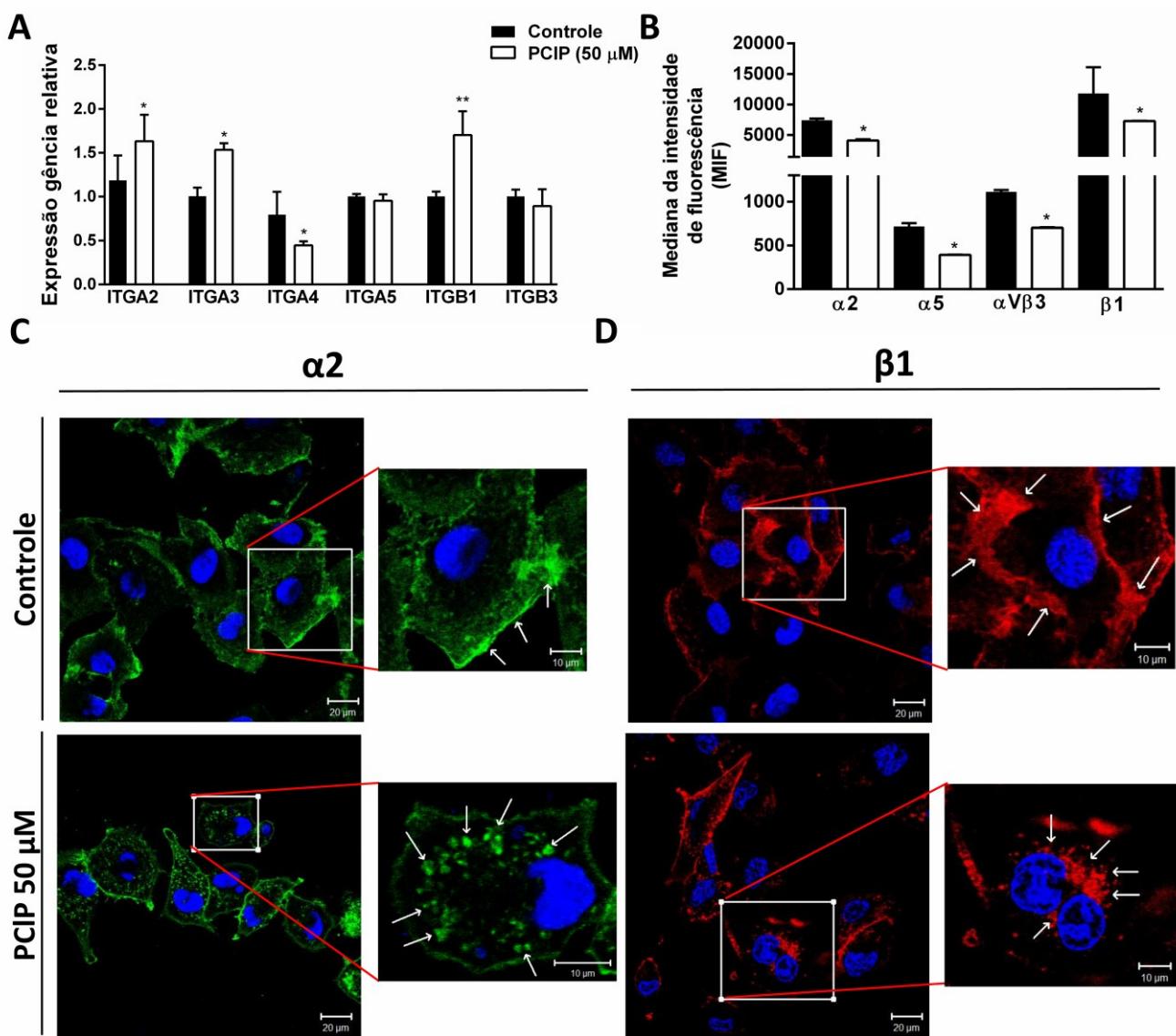


Figura 10 - Bloqueio da atividade da Myo1c interfere em vias relacionadas com o tráfego intracelular de integrinas. (A) O tratamento com PCIP promoveu uma regulação positiva da expressão de ITGA2, ITGA3, ITGB1 e uma modulação negativa de ITGA4, em comparação com o grupo controle (células não tratadas). (B) Representação gráfica dos valores medianos da expressão de integrinas na membrana plasmática das células HUVECs. A inibição da Myo1c promoveu uma redução na mediana da intensidade de fluorescência das integrinas $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha V\beta 3$ e $\beta 1$. (C) Retenção e acúmulo da integrina $\alpha 2$ e (D) integrina $\beta 1$ no citoplasma de HUVECs tratadas com PCIP (setas brancas – destacam a localização das integrinas no grupo controle e tratado). Todos os dados são expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças entre tratamentos e controles foram analisadas pelo Student's t-test e Mann-Whitney test (A, B) (GraphPad Prism software, versão 6.01). Estatisticamente significativo: **P <0,005; *P <0,05. As imagens foram analisadas por microscópio de fluorescência confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Alemanha). Barras: 20 μ m ou 10 μ m. TO-PRO-3: marcação do núcleo celular em azul. Anti- $\alpha 2$ (CD49b): marcação da integrina $\alpha 2$ em verde. Anti- $\beta 1$ (CD29): marcação da integrina $\beta 1$ em vermelho.

5.3 Inibição da Myo1c mediada pelo tratamento com PCIP impede a progressão do ciclo celular na fase G1/S de ECs

Recentemente, Dzijak et al. (2012) (Dzijak *et al.*, 2012) e Ihnatovych (2012) (Ihnatovych *et al.*, 2012) revelaram que três isoformas codificadas pelo gene MYO1C entram no núcleo e são capazes de modular importantes funções na transcrição de DNA (Philimonenko *et al.*, 2004; Hofmann *et al.*, 2006), maturação do RNA (Obrdlik *et al.*, 2010) e remodelamento da cromatina (Percipalle *et al.*, 2006). Assim, propusemos avaliar os efeitos da inibição de Myo1c mediada por PCIP na progressão do ciclo celular de ECs.

Foi avaliado primeiro o impacto do tratamento com PCIP na fragmentação do DNA. Células HUVECs foram semeadas e incubadas com PCIP (50 μ M) ou meio de cultura (grupo controle) durante 24 h e o ensaio TUNEL foi realizado. Na **figura 11A**, apresentamos imagens representativas das HUVECs nas diferentes condições analisadas: controle negativo (células em que a reação de TUNEL foi feita sem enzima TdT), controle positivo (células pré-tratadas com 1 unidade/mL de DNase I), controle (sem tratamento com PC1P) e tratados com PC1P. O DIC (contraste de interferência diferencial) mostra o contraste das células sob exposição à luz branca, que evidencia a morfologia das HUVECs após o tratamento com PC1P. O *merged* demonstra a sobreposição entre DAPI (usado para marcar DNA nuclear) e as quebras da dupla fita de DNA (DSB) (usado para capturar a fluorescência verde emitida pelas células TUNEL positivas, que representam o DSB). Os quadrados brancos tracejados destacam as células representativas de cada condição e sua decomposição (em DAPI e DSB) e estão presentes ao lado direito da figura. Observamos que após o tratamento, as células apresentavam DNA fragmentado no núcleo, em comparação com o grupo controle (células não tratadas) (**Figura 11A, B**). No entanto, o ensaio de apoptose mostrou que o tratamento com PCIP não foi capaz de induzir a morte celular (**Figura 11C**).

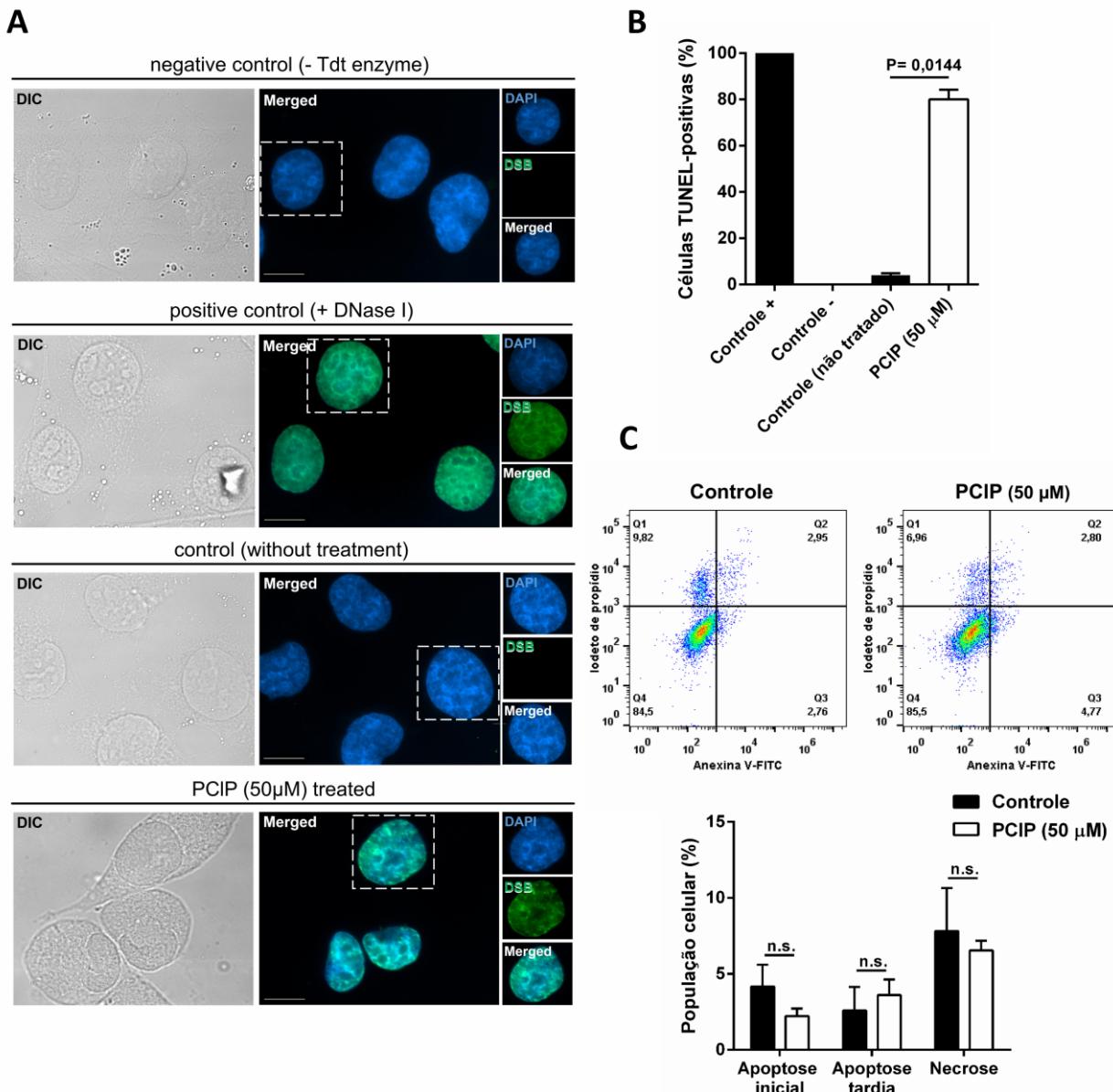


Figura 11 - Análise da integridade do DNA e morte celular de células HUVECs tratadas com PCIP.

(A) Imagens representativas foram organizadas de acordo com as condições analisadas [controle negativo (ausência da enzima Tdt), controle positivo (presença de DNase I), controle (sem tratamento com PCIP) e tratamento com PCIP (50 μ M)]. DIC evidencia a morfologia das células. O “Merged” representa a sobreposição entre o núcleo marcado com DAPI (azul) e o dano ao DNA (verde). A barra corresponde a 10 μ m. (B) Representação gráfica da porcentagem de células TUNEL-positivas. HUVECs tratadas com PCIP por 24 h apresentaram DNA fragmentado no núcleo, em comparação com o grupo controle (células não tratadas). (C) A análise de apoptose por anexina-V e PI (iodeto de propídio) mostrou que o tratamento com PCIP (50 μ M) não foi capaz de induzir morte celular em HUVECs no tempo analisado. As células foram analisadas usando um microscópio fluorescente Olympus Bx51 (aumento 100x) acoplado a uma lâmpada EXFO Xcite série 120Q e uma câmera digital Olympus XM10 com software de controlador de câmera Olympus Cell F (Olympus, Japão). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão dos experimentos realizados em triplicata. Diferenças significativas foram determinadas pelo one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test (B) e two-way ANOVA e Sidak's multiple comparisons test (C) (GraphPad Prism software, versão 6.01). As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. n.s.: não significativo.

Além disso, para melhor compreensão dos nossos resultados, avaliamos a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular (G1, S, G2/M) através da quantificação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo. Observamos que o tratamento com PCIP (50 μ M) causou um acúmulo significativo de células em G1 e uma diminuição no número de células nas fases S e G2/M, o que sugere uma parada na fase G1/S em comparação com o controle não tratado (**Figura 12A**).

Após o dano ao DNA, pontos de verificação/checagem (checkpoints) do ciclo celular impedem a progressão para a próxima fase do ciclo celular até que o dano seja reparado, a fim de garantir que as mutações resultantes de danos no DNA não sejam passadas para as gerações filhas (Senturk e Manfredi, 2013). Quando as lesões do DNA são reparadas, as células retomam a progressão do ciclo celular (recuperação dos checkpoints). Se o dano ao DNA for irreparável, outras vias podem ser ativadas, o que pode resultar em uma parada permanentemente do ciclo (senescência) ou morte celular programada (Hartwell e Weinert, 1989). Sugerimos que, as quebras da fita de DNA observadas em resposta ao bloqueio da atividade da Myo1c pelo PCIP, causam uma ativação de proteínas mediadoras que regulam a transcrição de proteínas efetoras que desempenham um papel importante em deter o ciclo celular até que o dano no DNA seja reparado. Para sustentar nossa hipótese, analisamos a expressão de alguns genes associados à progressão do ciclo celular.

O bloqueio da Myo1c modulou a expressão de sete importantes genes envolvidos no controle do ciclo celular. O tratamento com PCIP regulou positivamente a expressão da quinase ataxia telangiectasia mutada (ATM), ciclina E1 (CCNE1), quinase 4 dependente de ciclina (CDK4), inibidor de quinase dependente de ciclina 1A (CDKN1A/p21) e regulou negativamente a expressão do ciclo de divisão celular 25A (CDC25A), CDK2 e CDKN2A (**Figura 12B**). Além disso, o tratamento com PCIP não alterou a expressão da ciclina D1 (CCND1), do checkpoint kinase 1 (CHEK1) e do checkpoint kinase 2 (CHEK2) (dados não mostrados).

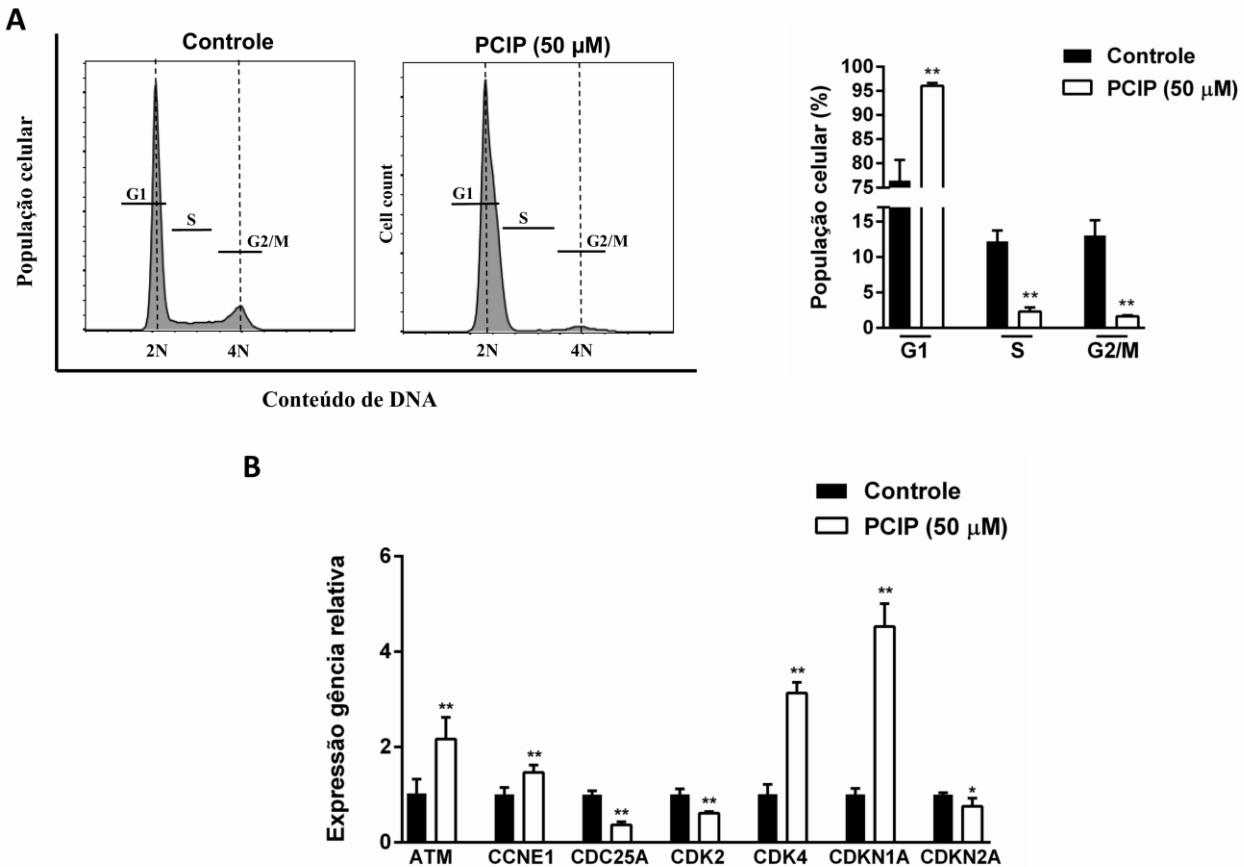


Figura 12 - Inibição da Myo1c pelo PCIP interrompeu a progressão do ciclo celular e modulou a expressão de genes associados à progressão do ciclo. (A) A análise do ciclo celular demonstrou que o tratamento com 50 μ M de PCIP causou uma parada significativa na fase G1 e foi capaz de promover uma diminuição no número de células na fase S e G2/M, em comparação com o controle não tratado. (B) A análise da expressão relativa de alguns genes associados à progressão do ciclo celular mostrou que o bloqueio da Myo1c causou uma regulação positiva da expressão da ATM, CCNE1, CDK4, CDKN1A/p21) e regulação negativa de CDC25A, CDK2 e CDKN2A. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças entre tratamentos e controles foram analisadas pelo Student's t-test e Mann-Whitney test (A, B) (GraphPad Prism software, versão 6.01). Estatisticamente significativo: **P <0,005; *P <0,05.

As células apresentam vários mecanismos para detectar e reparar os vários tipos de danos que podem ocorrer ao DNA. Durante a progressão através da fase G1 do ciclo celular, dois tipos principais de ciclinas são necessários: ciclina D e ciclina E. Durante a progressão do ciclo celular, a ciclina D1 ativa principalmente CDK4 e 6 (complexo proteína CCND1-CDK4/6), e pouco antes para a transição G1/S, a ciclina E ativa o

CDK2 (complexo proteico CCNE1-CDK2) (Sherr, 1994; Lipinski e Jacks, 1999; Agami e Bernards, 2000).

A parada (arrest) do ciclo celular em resposta ao dano no DNA requer a participação dos inibidores de CDK (CKIs), que incluem CDKN1A/p21, p27 e p57 (Morgan, 1995). Esses CKIs se ligam aos complexos de proteínas CCND1-CDK4/6 e CCNE1-CDK2, culminando na inibição da transição G1/S (Sherr e Roberts, 1999). Além disso, foi demonstrado que CDKN1A inibe o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), um componente dos complexos ciclina-CDK, de mediar o alongamento durante a replicação, impedindo assim a replicação em células que já tenham entrado na fase S (Mailand *et al.*, 2013).

Observamos a formação de quebras na dupla fita de DNA em HUVECs tratadas com PCIP (50 μ M) por 24 h. No entanto, esse dano não promoveu a morte celular, o que foi demonstrado pelos ensaios de MTT, Rodamina 123 e apoptose. Com base em nossos resultados e na literatura, sugerimos que o dano ao DNA causado pela inibição da Myo1c pelo PCIP é reversível e promove uma parada na progressão do ciclo celular, o que permite o reparo do DNA fragmentado.

Assim, propomos que os DSBs gerados pelo tratamento com PCIP sejam reparados, as células retomam a progressão do ciclo celular (recuperação dos checkpoints) e não sofrem morte celular. Esta hipótese é parcialmente apoiada pelo ensaio de recuperação da proliferação celular. Através deste ensaio, demonstramos que após 24 h, quando o tratamento com PCIP foi removido, as células recuperaram a capacidade de proliferação e a taxa de proliferação destas células tendeu a ser igual às células não tratadas (**Figura 13**), destacando que o dano ao DNA foi provavelmente reparado. Além disso, esses dados também estão de acordo com Chinthalapudi *et al.* (2011) (Chinthalapudi *et al.*, 2011), que demonstraram que o PCIP atua como um inibidor reversível da atividade Myo1c.

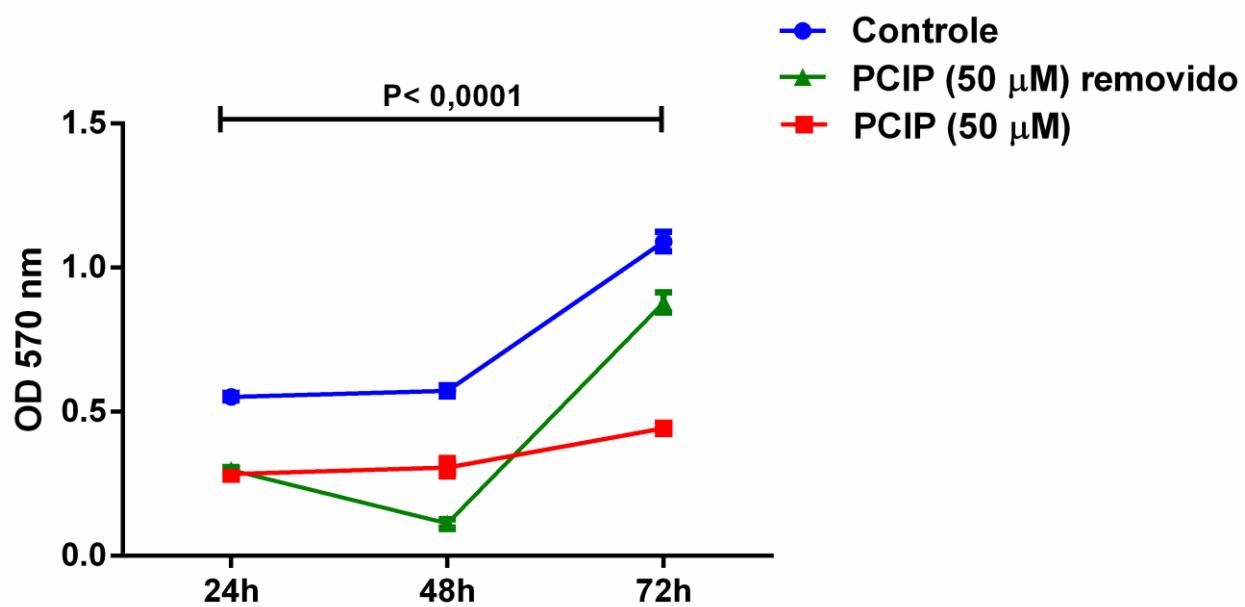


Figura 13 - Células HUVECs recuperam a capacidade proliferativa após a remoção do tratamento com PCIP. Para realização deste ensaio, células HUVECs foram semeadas em microplacas. Após adesão, os poços foram tratados ou não com PCIP. Após 24h, o PCIP foi removido apenas do grupo: [PCIP (50 μ M) removido], e o meio de cultura sem tratamento foi adicionado e a proliferação foi acompanhada até 72h. Observamos que após 24 h, quando o tratamento com PCIP foi removido e meio cultura sem tratamento foi adicionado, as células recuperaram a capacidade de proliferação e a taxa de proliferação destas células tendeu a ser igual às células não tratadas. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas foram determinadas usando two-way ANOVA e Sidak's multiple comparisons test (GraphPad Prism software, versão 6.01). Diferenças foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

6. Conclusão

Neste estudo, nós relatamos os efeitos da inibição da Myo1c desencadeada por PCIP (um inibidor seletivo, reversível e alostérico de Myo1c) durante a formação de vasos sanguíneos. Observamos que o bloqueio da atividade de Myo1c pela PCIP promoveu a inibição da angiogênese e que a Myo1c é necessária para a proliferação celular, migração, adesão e polimerização de actina. Além disso, mostramos que esta proteína está envolvida no tráfego intracelular de integrinas e modula funções importantes durante a progressão do ciclo celular de ECs. Tomados em conjunto, concluímos que a Myo1c é uma proeminente proteína envolvida em muitas vias de transdução de sinal em toda a célula e está diretamente relacionada à angiogênese, tornando esta proteína um alvo atraente para o tratamento baseado em drogas de doenças humanas relacionadas à angiogênese.

7. Produção científica durante o doutorado

www.nature.com/scientificreports/

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Trypanosoma cruzi P21: a potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy

Received: 26 November 2014

Accepted: 21 October 2015

Published: 17 November 2015

Thaise Lara Teixeira^{1,*}, Fabrício Castro Machado^{1,2,*}, Aline Alves da Silva^{1,*}, Samuel Cota Teixeira^{1,*}, Bruna Cristina Borges¹, Marlus Alves dos Santos¹, Flávia Alves Martins¹, Paula Cristina Brígido¹, Adele Aud Rodrigues¹, Ana Flávia Oliveira Notário¹, Bruno Antônio Ferreira¹, João Paulo Silva Servato¹, Simone Ramos Deconte¹, Daiana Silva Lopes³, Veridiana Melo Rodrigues Ávila³, Fernanda de Assis Araújo¹, Tatiana Carla Tomissos¹, Marcelo José Barbosa Silva¹ & Claudio Vieira da Silva¹

Acta Tropica 157 (2016) 42–53



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica



A high throughput analysis of cytokines and chemokines expression during the course of *Trypanosoma cruzi* experimental oral infection



Adele A. Rodrigues^a, Ana Flávia O. Notário^a, Thaise L. Teixeira^a, Rebecca T. e Silva^a, Amanda P.N. Quintal^a, Rosiane N. Alves^a, Paula C. Brígido^a, Carla S. Siqueira^b, Flávia A. Martins^a, Fabrício C. Machado^{a,c}, Tatiana M. Clemente^{a,c}, Aline A. da Silva^a, Bruna C. Borges^a, Samuel C. Teixeira^a, Marlus A. dos Santos^a, Claudio V. da Silva^{a,*}

^a Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

^b Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

^c Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil, Brazil

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Mechanistic Insights into the Anti-angiogenic Activity of *Trypanosoma cruzi* Protein 21 and its Potential Impact on the Onset of Chagasic Cardiomyopathy

Received: 29 July 2016

Accepted: 17 February 2017

Published: 21 March 2017

Samuel Cota Teixeira¹, Daiana Silva Lopes², Sarah Natalie Cirilo Gimenes², Thaise Lara Teixeira¹, Marcelo Santos da Silva³, Rebecca Tavares e Silva Brígido⁴, Felipe Andrés Cordero da Luz², Aline Alves da Silva⁴, Makswell Almeida Silva², Pilar Veras Florentino⁶, Paula Cristina Brígido Tavares¹, Marlus Alves dos Santos¹, Veridiana de Melo Rodrigues Ávila², Marcelo José Barbosa Silva⁵, Maria Carolina Elias³, Renato Arruda Mortara⁶ & Cláudio Vieira da Silva¹

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Antitumoral effects of γ CdcPLI, a PLA₂ inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* via PI3K/Akt pathway on MDA-MB-231 breast cancer cell

Received: 17 March 2017

Accepted: 22 June 2017

Published online: 1 August 2017

Sarah N. C. Gimenes¹, Daiana S. Lopes¹, Patrícia T. Alves¹, Fernanda V. P. V. Azevedo¹, Lara Vecchi¹, Luiz R. Goulart¹, Thais C. S. Rodrigues¹, André L. Q. Santos¹, Vera L. de C. Brites¹, Thaise L. Teixeira¹, Cláudio V. da Silva¹, Matheus H. Dias², Samuel C. Teixeira¹, Renata S. Rodrigues¹, Kelly A. G. Yoneyama¹, Ricardo A. Oliveira¹ & Veridiana de M. Rodrigues¹



Galectin-3: A Friend but Not a Foe during *Trypanosoma cruzi* Experimental Infection

Aline A. da Silva ^{1*}, Thaise L. Teixeira ¹, Samuel C. Teixeira ¹, Fabricio C. Machado ^{1,2}, Marlus A. dos Santos ¹, Tatiana C. Tomissso ¹, Paula C. B. Tavares ¹, Rebecca T. e Silva Brígido ¹, Flávia Alves Martins ¹, Nadjania S. de Lira Silva ^{1,2}, Cassiano C. Rodrigues ¹, Maria C. Roque-Barreira ², Renato A. Mortara ², Daiana S. Lopes ⁴, Veridiana de Melo Rodrigues Ávila ⁴ and Claudio V. da Silva ^{1*}

¹ Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brazil

² Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São

Paulo, São Paulo, Brazil, ³ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil,

⁴ Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brazil

International Journal of Biological Macromolecules 118 (2018) 311–319



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>



Genotoxic effects of BnSP-6, a Lys-49 phospholipase A₂ (PLA₂) homologue from *Bothrops pauloensis* snake venom, on MDA-MB-231 breast cancer cells



Makswell Almeida Silva ^{a,1}, Daiana Silva Lopes ^{a,1}, Samuel Cota Teixeira ^{b,1}, Sarah Natalie Cirilo Gimenes ^a, Fernanda Van Petten Vasconcelos Azevedo ^a, Lorena Polloni ^c, Bruna Cristina Borges ^d, Marcelo Santos da Silva ^e, Marcelo José Barbosa ^d, Robson José de Oliveira Júnior ^c, Maria Carolina Elias ^e, Claudio Vieira da Silva ^b, Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama ^a, Veridiana de Melo Rodrigues ^{a,*}, Renata Santos Rodrigues ^{a,*}

8. Referências bibliográficas

ACHE, D. C. et al. Biochemical properties of a new PI SVMP from Bothrops pauloensis: inhibition of cell adhesion and angiogenesis. **Int J Biol Macromol**, v. 72, p. 445-53, Jan 2015. ISSN 0141-8130. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.050>

ADAMS, R. H.; EICHMANN, A. Axon guidance molecules in vascular patterning. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 2, n. 5, p. a001875, May 2010. ISSN 1943-0264. doi: [10.1101/cshperspect.a001875](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001875)

ADAMS, R. J.; POLLARD, T. D. Binding of myosin I to membrane lipids. **Nature**, v. 340, n. 6234, p. 565-8, Aug 17 1989. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.

AGAMI, R.; BERNARDS, R. Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G1 cell cycle arrest in response to DNA damage. **Cell**, v. 102, n. 1, p. 55-66, Jul 7 2000. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674.

AGLEY, C. C. et al. An image analysis method for the precise selection and quantitation of fluorescently labeled cellular constituents: application to the measurement of human muscle cells in culture. **J Histochem Cytochem**, v. 60, n. 6, p. 428-38, Jun 2012. ISSN 0022-1554. doi: [10.1369/0022155412442897](https://doi.org/10.1369/0022155412442897)

ARIF, E. et al. Motor protein Myo1c is a podocyte protein that facilitates the transport of slit diaphragm protein Neph1 to the podocyte membrane. **Mol Cell Biol**, v. 31, n. 10, p. 2134-50, May 2011. ISSN 0270-7306.

ARMULIK, A.; ABRAMSSON, A.; BETSHOLTZ, C. Endothelial/pericyte interactions. **Circ Res**, v. 97, n. 6, p. 512-23, Sep 16 2005. ISSN 0009-7330.

AUGUSTIN, H. G. et al. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 3, p. 165-77, Mar 2009. ISSN 1471-0072.

BAKER, M. et al. Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. **Nat Protoc**, v. 7, n. 1, p. 89-104, Dec 22 2011. ISSN 1750-2799.
DOI: [10.1038/nprot.2011.435](https://doi.org/10.1038/nprot.2011.435)

BALDO, C. et al. Jararhagin disruption of endothelial cell anchorage is enhanced in collagen enriched matrices. **Toxicon**, v. 108, p. 240-8, Dec 15 2015. ISSN 0041-0101.

BARILE, M. et al. Large scale protein identification in intracellular aquaporin-2 vesicles from renal inner medullary collecting duct. **Mol Cell Proteomics**, v. 4, n. 8, p. 1095-106, Aug 2005. ISSN 1535-9476 (Print)
1535-9476.

BARYLKO, B.; JUNG, G.; ALBANESI, J. P. Structure, function, and regulation of myosin 1C. **Acta Biochim Pol**, v. 52, n. 2, p. 373-80, 2005. ISSN 0001-527x.

BAYLESS, K. J.; JOHNSON, G. A. Role of the cytoskeleton in formation and maintenance of angiogenic sprouts. **J Vasc Res**, v. 48, n. 5, p. 369-85, 2011. ISSN 1018-1172.

BAYLESS, K. J.; SALAZAR, R.; DAVIS, G. E. RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the alpha(v)beta(3) and alpha(5)beta(1) integrins. **Am J Pathol**, v. 156, n. 5, p. 1673-83, May 2000. ISSN 0002-9440 (Print)
0002-9440.

BAZZONI, G.; DEJANA, E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. **Physiol Rev**, v. 84, n. 3, p. 869-901, Jul 2004. ISSN 0031-9333 (Print)
0031-9333. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2003>

BENEDITO, R. et al. The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. **Cell**, v. 137, n. 6, p. 1124-35, Jun 12 2009. ISSN 0092-8674.

BERGERS, G.; HANAHAN, D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 8, p. 592-603, Aug 2008. ISSN 1474-175x.

BLASI, F.; CARMELIET, P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 3, n. 12, p. 932-43, Dec 2002. ISSN 1471-0072 (Print)
1471-0072.

BOND, L. M. et al. Functional roles for myosin 1c in cellular signaling pathways. **Cell Signal**, v. 25, n. 1, p. 229-35, Jan 2013. ISSN 0898-6568.
doi: [10.1016/j.cellsig.2012.09.026](https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.09.026)

BONILHA, V. L. Focus on molecules: ezrin. **Exp Eye Res**, v. 84, n. 4, p. 613-4, Apr 2007. ISSN 0014-4835 (Print)
0014-4835.

BOSE, A. et al. Glucose transporter recycling in response to insulin is facilitated by myosin Myo1c. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 821-4, Dec 19-26 2002. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836.

BOSE, A. et al. Unconventional myosin Myo1c promotes membrane fusion in a regulated exocytic pathway. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 12, p. 5447-58, Jun 2004. ISSN 0270-7306 (Print)
0270-7306.

BRAMBILLA, D.; FAIS, S. The Janus-faced role of ezrin in "linking" cells to either normal or metastatic phenotype. **Int J Cancer**, v. 125, n. 10, p. 2239-45, Nov 15 2009. ISSN 0020-7136. <https://doi.org/10.1002/ijc.24734>

BRANDSTAETTER, H.; KENDRICK-JONES, J.; BUSS, F. Myo1c regulates lipid raft recycling to control cell spreading, migration and *Salmonella* invasion. **J Cell Sci**, v. 125, n. Pt 8, p. 1991-2003, Apr 15 2012. ISSN 0021-9533.

BROOKS, P. C.; CLARK, R. A.; CHERESH, D. A. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. **Science**, v. 264, n. 5158, p. 569-71, Apr 22 1994. ISSN 0036-8075 (Print)
0036-8075.

BROOKS, P. C. et al. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. **Cell**, v. 85, n. 5, p. 683-93, May 31 1996. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nat Med**, v. 9, n. 6, p. 653-60, Jun 2003. ISSN 1078-8956 (Print)
1078-8956.

_____. Manipulating angiogenesis in medicine. **J Intern Med**, v. 255, n. 5, p. 538-61, May 2004. ISSN 0954-6820 (Print)
0954-6820.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 298-307, May 19 2011. ISSN 0028-0836.

CARMELIET, P. et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. **Nat Med**, v. 7, n. 5, p. 575-83, May 2001. ISSN 1078-8956 (Print)

1078-8956.

CHERESH, D. A. et al. A novel vitronectin receptor integrin (alpha v beta x) is responsible for distinct adhesive properties of carcinoma cells. **Cell**, v. 57, n. 1, p. 59-69, Apr 7 1989. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674.

CHINTHALAPUDI, K. et al. Mechanism and specificity of pentachloropseudilin-mediated inhibition of myosin motor activity. **J Biol Chem**, v. 286, n. 34, p. 29700-8, Aug 26 2011. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M111.239210

CLAUSE, K. C.; BARKER, T. H. Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair. **Curr Opin Biotechnol**, v. 24, n. 5, p. 830-3, Oct 2013. ISSN 0958-1669.

CRISMAN, H. A.; STEINKAMP, J. A. Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. **J Cell Biol**, v. 59, n. 3, p. 766-71, Dec 1973. ISSN 0021-9525 (Print)
0021-9525.

DAVIS, G. E.; BAYLESS, K. J. An integrin and Rho GTPase-dependent pinocytic vacuole mechanism controls capillary lumen formation in collagen and fibrin matrices. **Microcirculation**, v. 10, n. 1, p. 27-44, Jan 2003. ISSN 1073-9688 (Print)
1073-9688.

DAVIS, G. E.; CAMARILLO, C. W. An alpha 2 beta 1 integrin-dependent pinocytic mechanism involving intracellular vacuole formation and coalescence regulates capillary lumen and tube formation in three-dimensional collagen matrix. **Exp Cell Res**, v. 224, n. 1, p. 39-51, Apr 10 1996. ISSN 0014-4827 (Print)
0014-4827.

DAVIS, G. E.; SENGER, D. R. Extracellular matrix mediates a molecular balance between vascular morphogenesis and regression. **Curr Opin Hematol**, v. 15, n. 3, p. 197-203, May 2008. ISSN 1065-6251 (Print)
1065-6251.

DE LA CRUZ, E. M.; OSTAP, E. M. Relating biochemistry and function in the myosin superfamily. **Curr Opin Cell Biol**, v. 16, n. 1, p. 61-7, Feb 2004. ISSN 0955-0674 (Print)
0955-0674.

DE PALMA, M. et al. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of

pericyte progenitors. **Cancer Cell**, v. 8, n. 3, p. 211-26, Sep 2005. ISSN 1535-6108 (Print)
1535-6108.

DEJANA, E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5, n. 4, p. 261-70, Apr 2004. ISSN 1471-0072 (Print)
1471-0072. [DOI: 10.1038/nrm1357](https://doi.org/10.1038/nrm1357)

_____. The role of wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis. **Circ Res**, v. 107, n. 8, p. 943-52, Oct 15 2010. ISSN 0009-7330.

DIEFENBACH, T. J. et al. Myosin 1c and myosin IIB serve opposing roles in lamellipodial dynamics of the neuronal growth cone. **J Cell Biol**, v. 158, n. 7, p. 1207-17, Sep 30 2002. ISSN 0021-9525 (Print)
0021-9525.

DRAKE, C. J.; CHERESH, D. A.; LITTLE, C. D. An antagonist of integrin alpha v beta 3 prevents maturation of blood vessels during embryonic neovascularization. **J Cell Sci**, v. 108 (Pt 7), p. 2655-61, Jul 1995. ISSN 0021-9533 (Print)
0021-9533.

DRAKE, C. J.; DAVIS, L. A.; LITTLE, C. D. Antibodies to beta 1-integrins cause alterations of aortic vasculogenesis, in vivo. **Dev Dyn**, v. 193, n. 1, p. 83-91, Jan 1992. ISSN 1058-8388 (Print)
1058-8388.

DZIJAJK, R. et al. Specific nuclear localizing sequence directs two myosin isoforms to the cell nucleus in calmodulin-sensitive manner. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30529, 2012. ISSN 1932-6203.

ENGLISH, D. et al. Lipid mediators of angiogenesis and the signalling pathways they initiate. **Biochim Biophys Acta**, v. 1582, n. 1-3, p. 228-39, May 23 2002. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002.

FAN, Y. et al. Myo1c facilitates G-actin transport to the leading edge of migrating endothelial cells. **J Cell Biol**, v. 198, n. 1, p. 47-55, Jul 9 2012. ISSN 0021-9525.

FISCHER, C. et al. FLT1 and its ligands VEGFB and PIGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 12, p. 942-56, Dec 2008. ISSN 1474-175x.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 4, p. 273-86, Apr 2007. ISSN 1474-1776 (Print) 1474-1776. [DOI: 10.1038/nrd2115](https://doi.org/10.1038/nrd2115)

FRANCIS, M. E.; URIEL, S.; BREY, E. M. Endothelial cell-matrix interactions in neovascularization. **Tissue Eng Part B Rev**, v. 14, n. 1, p. 19-32, Mar 2008. ISSN 1937-3368 (Print) 1937-3368.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **J Cell Sci**, v. 123, n. Pt 24, p. 4195-200, Dec 15 2010. ISSN 0021-9533.

GEEVES, M. A. Review: The ATPase mechanism of myosin and actomyosin. **Biopolymers**, v. 105, n. 8, p. 483-91, Aug 2016. ISSN 0006-3525.

GIMENES, S. N. C. et al. Antitumoral effects of gammaCdcPLI, a PLA2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* via PI3K/Akt pathway on MDA-MB-231 breast cancer cell. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 7077, Aug 1 2017. ISSN 2045-2322.

GIROUX, S. et al. Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. **Curr Biol**, v. 9, n. 7, p. 369-72, Apr 8 1999. ISSN 0960-9822 (Print) 0960-9822.

GOODE, B. L.; DRUBIN, D. G.; BARNES, G. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. **Curr Opin Cell Biol**, v. 12, n. 1, p. 63-71, Feb 2000. ISSN 0955-0674 (Print) 0955-0674.

GREENBERG, M. J.; OSTAP, E. M. Regulation and control of myosin-I by the motor and light chain-binding domains. **Trends Cell Biol**, v. 23, n. 2, p. 81-9, Feb 2013. ISSN 0962-8924.

GUPTA, P. et al. Myosin-1 inhibition by PCIP affects membrane shape, cortical actin distribution and lipid droplet dynamics in early Zebrafish embryos. **PLoS One**, v. 12, n. 7, p. e0180301, 2017. ISSN 1932-6203. [DOI: 10.1371/journal.pone.0180301](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180301)

HARTMAN, M. A. et al. Principles of unconventional myosin function and targeting. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 27, p. 133-55, 2011. ISSN 1081-0706.

HARTWELL, L. H.; WEINERT, T. A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, v. 246, n. 4930, p. 629-34, Nov 3 1989. ISSN 0036-8075 (Print)
0036-8075.

HAYDEN, S. M.; WOLENSKI, J. S.; MOOSEKER, M. S. Binding of brush border myosin I to phospholipid vesicles. **J Cell Biol**, v. 111, n. 2, p. 443-51, Aug 1990. ISSN 0021-9525 (Print)
0021-9525.

HLA, T. Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate. **Semin Cell Dev Biol**, v. 15, n. 5, p. 513-20, Oct 2004. ISSN 1084-9521 (Print)
1084-9521. [DOI: 10.1016/j.semcdb.2004.05.002](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2004.05.002)

HOFMANN, W. A. et al. Nuclear myosin I is necessary for the formation of the first phosphodiester bond during transcription initiation by RNA polymerase II. **J Cell Biochem**, v. 99, n. 4, p. 1001-9, Nov 1 2006. ISSN 0730-2312 (Print)
0730-2312.

HOKANSON, D. E. et al. Myo1c binds phosphoinositides through a putative pleckstrin homology domain. **Mol Biol Cell**, v. 17, n. 11, p. 4856-65, Nov 2006. ISSN 1059-1524 (Print)
1059-1524.

HOKANSON, D. E.; OSTAP, E. M. Myo1c binds tightly and specifically to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 9, p. 3118-23, Feb 28 2006. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424. [DOI: 10.1073/pnas.0505685103](https://doi.org/10.1073/pnas.0505685103)

HU, D. E. et al. Correlation of ¹³³Xe clearance, blood flow and histology in the rat sponge model for angiogenesis. Further studies with angiogenic modifiers. **Lab Invest**, v. 72, n. 5, p. 601-10, May 1995. ISSN 0023-6837 (Print)
0023-6837.

HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 673-87, Sep 20 2002. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674.

IHNATOVYCH, I. et al. Identification and characterization of a novel myosin Ic isoform that localizes to the nucleus. **Cytoskeleton (Hoboken)**, v. 69, n. 8, p. 555-65, Aug 2012. ISSN 1949-3592. <https://doi.org/10.1002/cm.21040>

JAIN, R. K. et al. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 3, n. 1, p. 24-40, Jan 2006. ISSN 1743-4254 (Print) 1743-4254.

JAKOBSSON, L. et al. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. **Nat Cell Biol**, v. 12, n. 10, p. 943-53, Oct 2010. ISSN 1465-7392.

JUSTUS, C. R. et al. In vitro cell migration and invasion assays. **J Vis Exp**, n. 88, Jun 1 2014. ISSN 1940-087x.

KITTELBERGER, N. et al. The role of myosin 1c and myosin 1b in surfactant exocytosis. **J Cell Sci**, v. 129, n. 8, p. 1685-96, Apr 15 2016. ISSN 0021-9533.
[doi: 10.1242/jcs.181313](https://doi.org/10.1242/jcs.181313)

KLEMKE, R. L. et al. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. **J Cell Biol**, v. 137, n. 2, p. 481-92, Apr 21 1997. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525.

KRENDEL, M.; MOOSEKER, M. S. Myosins: tails (and heads) of functional diversity. **Physiology (Bethesda)**, v. 20, p. 239-51, Aug 2005. ISSN 1548-9213 (Print) 1548-9221.

KRISHAN, A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. **J Cell Biol**, v. 66, n. 1, p. 188-93, Jul 1975. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525.

LAMALICE, L.; LE BOEUF, F.; HUOT, J. Endothelial cell migration during angiogenesis. **Circ Res**, v. 100, n. 6, p. 782-94, Mar 30 2007. ISSN 0009-7330.

[DOI: 10.1161/01.RES.0000259593.07661.1e](https://doi.org/10.1161/01.RES.0000259593.07661.1e)

LI, S.; HUANG, N. F.; HSU, S. Mechanotransduction in endothelial cell migration. **J Cell Biochem**, v. 96, n. 6, p. 1110-26, Dec 15 2005. ISSN 0730-2312 (Print) 0730-2312.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Protoc**, v. 2, n. 2, p. 329-33, 2007. ISSN 1750-2799.

LIN, T.; TANG, N.; OSTAP, E. M. Biochemical and motile properties of Myo1b splice isoforms. **J Biol Chem**, v. 280, n. 50, p. 41562-7, Dec 16 2005. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

LIPINSKI, M. M.; JACKS, T. The retinoblastoma gene family in differentiation and development. **Oncogene**, v. 18, n. 55, p. 7873-82, Dec 20 1999. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232.

LOPES, D. S. et al. Gene expression of inflammatory mediators induced by jararhagin on endothelial cells. **Toxicon**, v. 60, n. 6, p. 1072-84, Nov 2012. ISSN 0041-0101.

LOPEZ, N. C. et al. Antiangiogenic and antitumor effects of Trypanosoma cruzi Calreticulin. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 7, p. e730, Jul 6 2010. ISSN 1935-2727.

MAHABELESHWAR, G. H. et al. Mechanisms of integrin-vascular endothelial growth factor receptor cross-activation in angiogenesis. **Circ Res**, v. 101, n. 6, p. 570-80, Sep 14 2007. ISSN 0009-7330.

MAILAND, N.; GIBBS-SEYMOUR, I.; BEKKER-JENSEN, S. Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 5, p. 269-82, May 2013. ISSN 1471-0072. [DOI: 10.1038/nrm3562](https://doi.org/10.1038/nrm3562)

MARAVILLAS-MONTERO, J. L. et al. Myosin 1c participates in B cell cytoskeleton rearrangements, is recruited to the immunologic synapse, and contributes to antigen presentation. **J Immunol**, v. 187, n. 6, p. 3053-63, Sep 15 2011. ISSN 0022-1767.

MARTIN, R. et al. Total synthesis of pentabromo- and pentachloropseudosudin, and synthetic analogues--allosteric inhibitors of myosin ATPase. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 48, n. 43, p. 8042-6, 2009. ISSN 1433-7851.

MCCONNELL, R. E.; TYSKA, M. J. Leveraging the membrane - cytoskeleton interface with myosin-1. **Trends Cell Biol**, v. 20, n. 7, p. 418-26, Jul 2010. ISSN 0962-8924. [DOI: 10.1016/j.tcb.2010.04.004](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.04.004)

MITRA, S. K.; HANSON, D. A.; SCHLAEPFER, D. D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 1, p. 56-68, Jan 2005. ISSN 1471-0072 (Print)

1471-0072.

MITRA, S. K.; SCHLAEPFER, D. D. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. **Curr Opin Cell Biol**, v. 18, n. 5, p. 516-23, Oct 2006. ISSN 0955-0674 (Print)
0955-0674.

MORGAN, D. O. Principles of CDK regulation. **Nature**, v. 374, n. 6518, p. 131-4, Mar 9 1995. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836. [DOI: 10.1038/374131a0](https://doi.org/10.1038/374131a0)

MOSCH, B. et al. Eph receptors and ephrin ligands: important players in angiogenesis and tumor angiogenesis. **J Oncol**, v. 2010, p. 135285, 2010. ISSN 1687-8450.

MURAKAMI, M. et al. The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. **J Clin Invest**, v. 118, n. 10, p. 3355-66, Oct 2008. ISSN 0021-9738 (Print)
0021-9738.

OBRDLIK, A. et al. Nuclear myosin 1 is in complex with mature rRNA transcripts and associates with the nuclear pore basket. **Faseb j**, v. 24, n. 1, p. 146-57, Jan 2010. ISSN 0892-6638.

PERCIPALLE, P. et al. The chromatin remodelling complex WSTF-SNF2h interacts with nuclear myosin 1 and has a role in RNA polymerase I transcription. **EMBO Rep**, v. 7, n. 5, p. 525-30, May 2006. ISSN 1469-221X (Print)
1469-221x.

PERRUZZI, C. A. et al. Functional overlap and cooperativity among alphav and beta1 integrin subfamilies during skin angiogenesis. **J Invest Dermatol**, v. 120, n. 6, p. 1100-9, Jun 2003. ISSN 0022-202X (Print)
0022-202x.

PHILIMONENKO, V. V. et al. Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. **Nat Cell Biol**, v. 6, n. 12, p. 1165-72, Dec 2004. ISSN 1465-7392 (Print)
1465-7392. [DOI: 10.1038/ncb1190](https://doi.org/10.1038/ncb1190)

PHILLIPS, D. R.; NANNIZZI-ALAIMO, L.; PRASAD, K. S. Beta3 tyrosine phosphorylation in alphaIIbbeta3 (platelet membrane GP IIb-IIIa) outside-in integrin signaling. **Thromb Haemost**, v. 86, n. 1, p. 246-58, Jul 2001. ISSN 0340-6245 (Print)
0340-6245.

PHNG, L. K.; GERHARDT, H. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. **Dev Cell**, v. 16, n. 2, p. 196-208, Feb 2009. ISSN 1534-5807.

PHNG, L. K. et al. Nrp coordinates endothelial Notch and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis. **Dev Cell**, v. 16, n. 1, p. 70-82, Jan 2009. ISSN 1534-5807.

PLOW, E. F. et al. Ligand binding to integrins. **J Biol Chem**, v. 275, n. 29, p. 21785-8, Jul 21 2000. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258.

POLLARD, T. D.; BORISY, G. G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. **Cell**, v. 112, n. 4, p. 453-65, Feb 21 2003. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674.

POLLARD, T. D.; KORN, E. D. Acanthamoeba myosin. I. Isolation from Acanthamoeba castellanii of an enzyme similar to muscle myosin. **J Biol Chem**, v. 248, n. 13, p. 4682-90, Jul 10 1973. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258.

PRESTA, M. et al. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 16, n. 2, p. 159-78, Apr 2005. ISSN 1359-6101 (Print)
1359-6101.

RICHARDS, T. A.; CAVALIER-SMITH, T. Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. **Nature**, v. 436, n. 7054, p. 1113-8, Aug 25 2005. ISSN 0028-0836.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v. 386, n. 6626, p. 671-4, Apr 17 1997. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836.

RODRIGUES, A. A. et al. A recombinant protein based on *Trypanosoma cruzi* P21 enhances phagocytosis. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e51384, 2012. ISSN 1932-6203.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051384>

ROSS, J. L.; ALI, M. Y.; WARSHAW, D. M. Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton. **Curr Opin Cell Biol**, v. 20, n. 1, p. 41-7, Feb 2008. ISSN 0955-0674 (Print)
0955-0674.

SACHARIDOU, A. et al. Endothelial lumen signaling complexes control 3D matrix-specific tubulogenesis through interdependent Cdc42- and MT1-MMP-mediated events. **Blood**, v. 115, n. 25, p. 5259-69, Jun 24 2010. ISSN 0006-4971.

SAHARINEN, P. et al. Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts. **Nat Cell Biol**, v. 10, n. 5, p. 527-37, May 2008. ISSN 1465-7392.

SARSHAD, A. et al. Nuclear myosin 1c facilitates the chromatin modifications required to activate rRNA gene transcription and cell cycle progression. **PLoS Genet**, v. 9, n. 3, p. e1003397, Mar 2013. ISSN 1553-7390.

SAWAMIPHAK, S. et al. Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. **Nature**, v. 465, n. 7297, p. 487-91, May 27 2010. ISSN 0028-0836.

SENGER, D. R. et al. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 25, p. 13612-7, Dec 9 1997. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424.

SENGER, D. R. et al. The alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. **Am J Pathol**, v. 160, n. 1, p. 195-204, Jan 2002. ISSN 0002-9440 (Print)
0002-9440.

SENTURK, E.; MANFREDI, J. J. p53 and cell cycle effects after DNA damage. **Methods Mol Biol**, v. 962, p. 49-61, 2013. ISSN 1064-3745. doi: [10.1007/978-1-62703-236-0_4](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-236-0_4).

SHABARDINA, V. et al. Mode of Ezrin-Membrane Interaction as a Function of PIP2 Binding and Pseudophosphorylation. **Biophys J**, v. 110, n. 12, p. 2710-2719, Jun 21 2016. ISSN 0006-3495.

SHERR, C. J. G1 phase progression: cycling on cue. **Cell**, v. 79, n. 4, p. 551-5, Nov 18 1994. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674.

SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Dev**, v. 13, n. 12, p. 1501-12, Jun 15 1999. ISSN 0890-9369 (Print)
0890-9369.

SMALL, J. V.; RESCH, G. P. The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility. **Curr Opin Cell Biol**, v. 17, n. 5, p. 517-23, Oct 2005. ISSN 0955-0674 (Print)
0955-0674.

SMALL, J. V. et al. The lamellipodium: where motility begins. **Trends Cell Biol**, v. 12, n. 3, p. 112-20, Mar 2002. ISSN 0962-8924 (Print)
0962-8924.

SMITH, Y. E.; VELLANKI, S. H.; HOPKINS, A. M. Dynamic interplay between adhesion surfaces in carcinomas: Cell-cell and cell-matrix crosstalk. **World J Biol Chem**, v. 7, n. 1, p. 64-77, Feb 26 2016. ISSN 1949-8454 (Print)
1949-8454. [DOI: 10.4331/wjbc.v7.i1.64](https://doi.org/10.4331/wjbc.v7.i1.64)

TAKADA, Y.; YE, X.; SIMON, S. The integrins. **Genome Biol**, v. 8, n. 5, p. 215, 2007. ISSN 1474-7596.

TEIXEIRA, S. C. et al. Mechanistic Insights into the Anti-angiogenic Activity of Trypanosoma cruzi Protein 21 and its Potential Impact on the Onset of Chagasic Cardiomyopathy. **Sci Rep**, v. 7, p. 44978, Mar 21 2017. ISSN 2045-2322.

TEIXEIRA, T. L. et al. Trypanosoma cruzi P21: a potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy. **Sci Rep**, v. 5, p. 16877, Nov 17 2015. ISSN 2045-2322.
[DOI: 10.1038/srep16877](https://doi.org/10.1038/srep16877)

THOENES, L.; GUNTHER, M. Novel approaches in anti-angiogenic treatment targeting endothelial F-actin: a new anti-angiogenic strategy? **Curr Opin Mol Ther**, v. 10, n. 6, p. 579-90, Dec 2008. ISSN 1464-8431 (Print)
1464-8431.

TIWARI, A. et al. The myosin motor Myo1c is required for VEGFR2 delivery to the cell surface and for angiogenic signaling. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 304, n. 5, p. H687-96, Mar 1 2013. ISSN 0363-6135.

TONG, Q. et al. Hypoxia-induced mitogenic factor enhances angiogenesis by promoting proliferation and migration of endothelial cells. **Exp Cell Res**, v. 312, n. 18, p. 3559-69, Nov 1 2006. ISSN 0014-4827 (Print)
0014-4827.

TURNER, N.; GROSE, R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 2, p. 116-29, Feb 2010. ISSN 1474-175x.

UCUZIAN, A. A. et al. Molecular mediators of angiogenesis. **J Burn Care Res**, v. 31, n. 1, p. 158-75, Jan-Feb 2010. ISSN 1559-047x.

VAN HINSBERGH, V. W.; ENGELSE, M. A.; QUAX, P. H. Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 4, p. 716-28, Apr 2006. ISSN 1079-5642. [DOI: 10.1161/01.ATV.0000209518.58252.17](https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000209518.58252.17)

VAN HINSBERGH, V. W.; KOOLWIJK, P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. **Cardiovasc Res**, v. 78, n. 2, p. 203-12, May 1 2008. ISSN 0008-6363 (Print)
0008-6363.

VERHEUL, H. M.; VOEST, E. E.; SCHLINGEMANN, R. O. Are tumours angiogenesis-dependent? **J Pathol**, v. 202, n. 1, p. 5-13, Jan 2004. ISSN 0022-3417 (Print)
0022-3417.

WALLEZ, Y.; HUBER, P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1778, n. 3, p. 794-809, Mar 2008. ISSN 0006-3002 (Print)
0006-3002.

WELTI, J. et al. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. **J Clin Invest**, v. 123, n. 8, p. 3190-200, Aug 2013. ISSN 0021-9738. [DOI: 10.1172/JCI70212](https://doi.org/10.1172/JCI70212)

WOOLNER, S.; BEMENT, W. M. Unconventional myosins acting unconventionally. **Trends Cell Biol**, v. 19, n. 6, p. 245-52, Jun 2009. ISSN 0962-8924.

YUE, P. Y. et al. A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. **J Biomol Screen**, v. 15, n. 4, p. 427-33, Apr 2010. ISSN 1087-0571.

ZHAO, L. P. et al. Knockdown of ezrin suppresses the migration and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells in vitro. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, v. 36, n. 2, p. 243-8, Apr 2016. ISSN 1672-0733 (Print)
1672-0733. [DOI: 10.1007/s11596-016-1574-y](https://doi.org/10.1007/s11596-016-1574-y)

9. Anexos



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Ação antitumoral in vivo de toxinas isoladas da peçonha de *Bothrops pauloensis*”, protocolo nº 130/15, sob a responsabilidade de **Veridiana de Melo Rodrigues Ávila** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA)** da **UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**.

(We certify that the project entitled "Ação antitumoral in vivo de toxinas isoladas da peçonha de *Bothrops pauloensis*", protocol 130/15, under the responsibility of Veridiana de Melo Rodrigues Ávila - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA.

Vigência do Projeto	Início: 01/07/2017 Término: 30/06/2019
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	<i>Mus musculus</i> (Balb/c)
Número de animais	306
Peso / Idade	20-30g / 6 – 6 semanas
Sexo	Macho
Origem / Local	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 20 de março de 2017.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU