

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

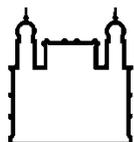
Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**Estudos sobre a função da subunidade  $\alpha 4$  de integrina em células T:  
inativação gênica e inserção de polimorfismos de nucleotídeo único no gene *ITGA4***

Lia Gonçalves Pinho

Rio de Janeiro

2019



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**Estudos sobre a função da subunidade  $\alpha 4$  de integrina em células T:  
inativação gênica e inserção de polimorfismos de nucleotídeo único no gene *ITGA4***

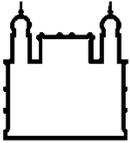
Lia Gonçalves Pinho

Dissertação apresentada ao Instituto  
Oswaldo Cruz como requisito parcial  
à obtenção do título de Mestre em  
Ciências na área de Biologia Celular e  
Molecular

Orientadores: Dr. Vinicius Cotta-de-Almeida  
Dra. Daniella Arêas Mendes-da-Cruz

Rio de Janeiro

28 de fevereiro de 2019



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

Gonçalves Pinho, Lia.

Estudos sobre a função da subunidade  $\alpha 4$  de integrina em células T: inativação gênica e inserção de polimorfismos de nucleotídeo único no gene *ITGA4* / Lia Gonçalves Pinho. - Rio de Janeiro, 2019.  
83 f.; il.

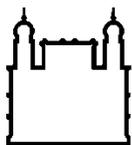
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

Orientador: Vinicius Cotta-de-Almeida.  
Co-orientadora: Daniella Arêas Mendes-da-Cruz.

Bibliografia: f. 72-84

1. Integrina. 2. VLA-4. 3. Sobrevida celular. 4. SNP. 5. Célula T. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manginhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**LIA GONÇALVES PINHO**

**Estudos sobre a função da subunidade  $\alpha 4$  de integrina em células T:  
inativação gênica e inserção de polimorfismos de nucleotídeo único no gene *ITGA4***

Orientadores: Dr. Vinicius Cotta-de-Almeida

Dra. Daniella Arêas Mendes-da-Cruz

**Examinadores:**

Dra. Andrea Henriques Pons / Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz

Dr. Leonardo Freire de Lima / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/RJ

Dra. Tatiana Maron Gutierrez / Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz

**Suplentes:**

Dr. Gustavo Monnerat Cahli / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/RJ

Dr. Zilton Farias Meira de Vasconcelos / Instituto Fernandes Figueira, Fiocruz

Rio de Janeiro, 28 de fevereiro de 2019

## EPÍGRAFE

“A ausência da evidência  
não significa evidência da ausência.”

Carl Sagan

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu grande amigo,  
**Carlos Felipe Machado de Araujo** (*in memoriam*),  
por toda inspiração, companheirismo e incentivo.

O melhor kaminoano que eu conheci.

## **AGRADECIMENTOS**

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio. Ao Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, pelo apoio financeiro e formação acadêmica. Aos meus orientadores Dr. Vinicius Cotta-de-Almeida e Dra. Daniella Arêas Mendes-da-Cruz pela excelente orientação e motivação. Ao Dr. Arnon Dias Jurberg pelas contribuições durante a execução dos experimentos e pela co-orientação.

Ao João Ramalho Ortigão-Farias por fornecer as avaliações do RNA-Seq que tanto auxiliaram nas conclusões desse trabalho; assim como à Dra. Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos do Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC), onde foi conduzido a avaliação de RNA-Seq.

À coordenadora Dra. Leila Mendonça-Lima, muito atenciosa e prestativa com os alunos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular (BCM). À Secretaria Acadêmica representada pela Julimar Loures da Silva Ferreira também, que também é exemplo de comprometimento com os estudantes da BCM. E a todo o Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular.

A todos os que contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho e na minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Estudos sobre a função da subunidade $\alpha 4$ de integrina em células T: inativação gênica e inserção de polimorfismos de nucleotídeo único no gene *ITGA4*

#### RESUMO

As integrinas são a principal família de proteínas de superfície celular mediadoras de interações intercelulares e com a matriz extracelular (ECM). Com isso, elas desempenham funções em processos celulares distintos, como a diferenciação, proliferação, morte e resposta imune. Além disso, variações nas regiões reguladoras e nas sequências gênicas parecem estar relacionadas com mudanças nos níveis de expressão das integrinas. Nesse sentido, estudos sobre os polimorfismos de base única (SNPs; do inglês, *single nucleotide polymorphisms*) são considerados centrais para o entendimento de doenças inflamatórias e autoimunes relacionadas a essas proteínas. Visando estudar o papel da integrina  $\alpha 4$  na biologia dos linfócitos T, definimos duas estratégias experimentais: i) gerar por CRISPR/Cas9 uma linhagem de células Jurkat deficiente geneticamente em *ITGA4* (*ITGA4-KO*); ii) identificação de SNPs do gene *ITGA4* e análise *in silico* do impacto da inserção desses SNPs sobre a relação estrutura-função da integrina VLA-4. Surpreendentemente, a caracterização inicial por sequenciamento massivo de RNA (RNA-Seq) revelou que a ausência da integrina  $\alpha 4$  modula 443 genes associados à morte celular. Dessa forma, buscando compreender o papel dessa integrina e de suas variantes na regulação de processos celulares e mecanismos moleculares relacionados à sobrevivência celular, decidimos investigar o impacto da ausência da integrina  $\alpha 4$  na linhagem deficiente em *ITGA4* em condições de estresse por privação de soro. Nossos achados indicam que as células mutantes parecem ser mais suscetíveis à ausência de nutrientes. Em comparação às células selvagens, a linhagem *ITGA4-KO* apresentou uma frequência de apoptose inicial duas vezes maior após 48 horas sem soro fetal bovino no meio de cultura. Contudo, nós observamos um aumento do número de vacúolos nas células mutantes para *ITGA4* em relação às células selvagens após 48 horas de privação de nutrientes, o que sugere autofagia. Provavelmente, o mecanismo pelo qual a subunidade  $\alpha 4$  modula a sobrevivência celular está relacionado à sua interação com outras proteínas. Por sua vez, com o intuito de avaliar a relevância das interações estruturais da subunidade  $\alpha 4$  de integrinas, nós analisamos variantes de nucleotídeo único em substituição à sequência referência. Nossos achados preliminares por bioinformática revelaram a existência de um total de 21.506 SNPs no gene *ITGA4* em *Homo sapiens*. Entre os SNPs não-sinônimos, identificamos duas substituições, rs35322532 (R1007S) e rs13029893 (S634T), possivelmente deletérias. Em seguida, realizamos *docking* molecular das subunidades  $\alpha 4$ , sem alterações ou contendo as variações R1007S e S634T, contra as três principais proteínas que interage, fibronectina, VCAM-1 e paxilina. A variante R1007S obteve os melhores parâmetros de encaixe com a paxilina, enquanto a variante S634T teve o resultado mais favorável contra o segmento IIICS da fibronectina. Os polimorfismos em diferentes porções da subunidade  $\alpha 4$  parecem produzir um aumento de afinidade aos seus ligantes naturais. Em conjunto, nossos estudos apontam para a possível relevância da integrina VLA-4 na sobrevivência de células T, assim como para o impacto de SNPs específicos na relação estrutura-função dessa integrina, com potencial efeito sobre o papel funcional de células T em condições fisiológicas e patológicas.

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### **Studies on the function of integrin $\alpha 4$ subunit in T cells: gene inactivation and insertion of single-nucleotide polymorphisms in the *ITGA4* gene**

#### **ABSTRACT**

Integrins are the main family of cell surface receptors, acting as mediators of intercellular interactions and with the extracellular matrix (ECM). As a result, they perform functions in different processes, including cell differentiation, proliferation, apoptosis and immune response. In addition, changes in expression levels of integrins seem to be related to variations in gene regulatory or coding sequences. Therefore, single nucleotide polymorphisms (SNPs) are considered of fundamental importance to understand integrin-associated inflammatory or autoimmune diseases. We have decided two experimental strategies to study the role of  $\alpha 4$  integrin in T lymphocyte biology: i) generate by CRISPR/Cas9 a genetically *ITGA4*-deficient Jurkat cell line (*ITGA4-KO*); ii) *ITGA4* SNPs identification and *in silico* evaluation of SNPs insertion in this gene on structure-function of VLA-4. Surprisingly, characterization by massive sequencing of RNA (RNA-Seq) have shown that loss of  $\alpha 4$  integrin modulates 443 cell death-associated genes. Aiming to comprehend the role of this integrin and its variants on regulation of biological processes and molecular mechanisms related to cell survival, we decided to investigate the impact of  $\alpha 4$  integrin in *ITGA4*-deficient Jurkat cell line under stress by serum deprivation. Indeed, serum-starved *ITGA4*-deficient cells were more susceptible to early apoptosis than wild type cells upon 48 h of incubation. However, we found that *ITGA4*-mutant cells showed an increased number of cytoplasmic vacuoles after this period, which suggests that loss of *ITGA4* make cells more prone to autophagy. Probably, the cell survival mechanism modulated by  $\alpha 4$  subunit is related to its interaction with other proteins. Moreover, aiming to dissect structural interactions of the  $\alpha 4$  integrin subunit, we have analyzed single nucleotide (SNP) variants by bioinformatics and found the existence of a total of 21.506 SNPs in the *ITGA4* gene of *Homo sapiens*. Among non-synonymous SNPs, we identified two substitutions, rs35322532 (R1007S) and rs13029893 (S634T), possibly deleterious. Then, we performed molecular docking of the wild type and the R1007S and S634T variants into its three major ligands, fibronectin, VCAM-1 and paxillin. The R1007S variant produced the best fit parameters with paxillin, while the S634T variant showed the most favorable result against the fibronectin IIIICS segment. Therefore, it seems the  $\alpha 4$  subunits with SNPs alterations bind better to their ligands, suggesting an affinity improvement of these interactions. Altogether, our studies indicate to a probable relevance of VLA-4 integrin in the cellular survival process, as well as the SNP impact on structure and function relationships of this integrin, with potential effect under cell T physiological and pathological conditions.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| EPÍGRAFE .....   | 4  |
| DEDICATÓRIA.....   | 5  |
| AGRADECIMENTOS .....   | 6  |
| RESUMO .....   | 7  |
| ABSTRACT .....   | 8  |
| SUMÁRIO.....   | 9  |
| LISTA DE FIGURAS .....   | 11 |
| LISTA DE QUADROS .....   | 12 |
| LISTA DE TABELAS .....   | 13 |
| LISTA DE ABREVIATURAS.....   | 14 |
| INTRODUÇÃO.....  | 15 |
| 1 Estrutura das integrinas .....   | 16 |
| 2 Integrinas na Resposta Imune.....  | 19 |
| 3 Integrinas e Câncer .....  | 21 |
| 4 Integrinas e Morte Celular.....  | 23 |
| 4.1 Tipos de morte celular .....   | 24 |
| 4.1.1 Necrose.....   | 26 |
| 4.1.2 Autofagia .....  | 26 |
| 4.1.3 Apoptose.....  | 29 |
| 5 VLA-4.....   | 32 |
| 5.1 VLA-4 e interações.....  | 32 |
| 5.1.1 Fibronectina.....  | 33 |
| 5.1.2 VCAM-1.....  | 35 |
| 5.1.3 Paxilina.....  | 36 |
| 6 Abordagem de bioinformática para estudos de estrutura-função .....                 | 36 |
| 7 Abordagens farmacogenômicas.....   | 38 |
| JUSTIFICATIVA.....   | 40 |
| OBJETIVOS.....   | 41 |
| Objetivo geral .....   | 41 |
| Objetivos específicos.....   | 41 |
| MATERIAL E MÉTODOS.....  | 42 |
| 1. Estabelecimento da linhagem celular de Jurkat ITGA4-KO .....                      | 42 |
| 2. Caracterização do perfil de expressão de células Jurkat mutantes para ITGA4 ..... | 42 |

|  |    |
|--|----|
| 3. Avaliação de estresse celular induzida por privação de soro.....  | 43 |
| 4. Identificação e predição in silico dos efeitos de SNPs em ITGA4 .....   | 44 |
| 5. Avaliação de alterações morfológicas .....  | 46 |
| RESULTADOS .....   | 47 |
| 1. A inativação da integrina $\alpha 4$ leva a uma alteração do perfil de expressão gênica associado à morte celular<br>47 |    |
| 2. Células mutantes para ITGA4 são mais suscetíveis à apoptose sob condições de estresse por privação de<br>soro 50        |    |
| 3. Morfologia celular .....  | 52 |
| 4. A inativação da integrina $\alpha 4$ ocasiona uma diferença na regulação de vias associadas à autofagia .....           | 55 |
| 5. Identificação de Polimorfismo de Nucleotídeo Único em ITGA4 .....   | 60 |
| 6. Predição dos efeitos de polimorfismos de base única em ITGA4 .....  | 60 |
| 6.1. Ligantes.....   | 60 |
| 6.1.1 Fibronectina.....  | 60 |
| 6.1.2 VCAM-1.....  | 61 |
| 6.1.3 Paxilina.....  | 62 |
| 6.2. Docking molecular .....   | 62 |
| DISCUSSÃO .....  | 65 |
| CONCLUSÃO.....   | 70 |
| PERSPECTIVAS .....   | 71 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 72 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. A estrutura da integrina VLA-4.....   | 17 |
| Figura 2. Interações das subunidades das integrinas.....  | 18 |
| Figura 3. Motivo proteico GFFKR altamente conservado entre subunidades $\alpha$ de integrinas.....  | 19 |
| Figura 4. Morfologia da macroautofagia.....   | 28 |
| Figura 5. Localização da fosfatidilserina na membrana plasmática de células.....  | 30 |
| Figura 6. Vias de sinalização envolvidas à proteína VLA-4.....  | 33 |
| Figura 7. Estrutura modular da fibronectina e seus domínios de interação.....   | 34 |
| Figure 8. Estrutura das formas de VCAM-1.....   | 35 |
| Figure 9. Esquema do processo de descoberta de um fármaco até após a sua introdução no mercado.....   | 38 |
| Figure 10. Avaliação de células utilizando Anexina-V e Iodeto de propídeo.....  | 44 |
| Figure 11. Deleção da subunidade $\alpha 4$ em linhagem Jurkat.....   | 47 |
| Figura 12. Gráfico tipo vulcão (volcano plot) de genes diferencialmente expressos entre linhagens de jurkat selvagem x deficiente em <i>ITGA4</i> .....     | 48 |
| Figura 13. Expressão diferencial de genes da via apoptótica intrínseca.....   | 49 |
| Figura 14. Expressão diferencial de genes da via apoptótica extrínseca.....   | 49 |
| Figura 15. Expressão diferencial dos genes casp3 e casp4.....   | 50 |
| Figura 16. A perda da integrina $\alpha 4$ torna as células mais suscetíveis à apoptose quando submetidas a condições de estresse por privação de soro..... | 51 |
| Figura 17. As células mutantes para <i>ITGA4</i> exibiram maior ativação de caspase-3 quando submetidas a condições de estresse por privação de soro.....   | 52 |
| Figura 18. Privação de nutrientes induz diferentes padrões morfológicos.....  | 53 |
| Figure 19. Área celular e circularidade em células Jurkat WT e <i>ITGA4</i> -KO submetidas à privação de soro   | 54 |
| Figure 20. Frequência de núcleos irregulares e cariorrexe em células Jurkat WT e <i>ITGA4</i> -KO submetidas à privação de soro.....                        | 54 |
| Figure 21. Via de HIF-1.....  | 56 |
| Figure 22. Via de PI3K-AKT.....   | 57 |
| Figura 23. Via de NF $\kappa$ B.....  | 58 |
| Figura 24. Perfil de perfil transcricional das linhagens Jurkat WT e <i>ITGA4</i> -KO.....  | 59 |
| Figura 25. Predições da estrutura secundária do Domínio IIIICS da Fibronectina.....   | 61 |
| Figure 26. Estrutura do cristal 1VCA.....   | 61 |
| Figura 27. Predições da estrutura secundária do fragmento 176-275 da paxilina.....  | 62 |
| Figura 28. <i>Docking</i> molecular para as subunidades $\alpha 4$ selvagem e as variantes R1007S e S634T.....  | 63 |
| Figura 29. Vias relacionadas a <i>ITGA4</i> e autofagia em células que não expressam a subunidade $\alpha 4$ de integrinas.....                             | 68 |

## **LISTA DE QUADROS**

|   |    |
|---|----|
| Quadro 1. Integrinas na progressão do câncer..... | 22 |
| Quadro 2. Diferentes tipos de morte celular.....  | 25 |

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. SNPs não-sinônimos selecionados para a cadeia  $\alpha 4$  de VLA-4, utilizando SNPs3D..... 60

## LISTA DE ABREVIATURAS

- APC – célula apresentadora de antígeno (do inglês, *antigen presenting cell*)
- ECM – matriz extracelular (do inglês, *extracellular matrix*)
- ERK – quinase regulada pela sinalização extracelular (do inglês, *extracellular signal-regulated kinase*)
- FN – fibronectina
- IAP – proteína inibidora de apoptose (do inglês, *inhibitor of apoptosis*)
- ICAM-1 – molécula de adesão intracelular-1 (do inglês, *intracellular adhesion molecule-1*)
- IL – interleucina
- ITGA4-KO – *ITGA4* deficiente (do inglês, *ITGA4 knockout*)
- LAMP-2A – proteína associada à membrana do lisossoma 2A (do inglês, *lysosome-associated membrane protein type 2A*)
- LC3 – proteína de cadeia leve associada a microtúbulo LC-3 (do inglês, *microtubule-associated protein light chain 3*)
- MIDAS – sítios de adesão dependente de íons metálicos (do inglês, *Metal Ion-Dependent Adhesion Site*)
- MHC – complexo principal de histocompatibilidade (do inglês, *major histocompatibility complex*)
- mRNA – RNA mensageiro (do inglês, *messenger RNA*)
- NF- $\kappa$ B – fator de transcrição nuclear kappa B (do inglês, *nuclear factor- $\kappa$ B*)
- R1P1 – receptor-proteína interativa tipo 1 (do inglês, *receptor-interacting protein*)
- SNP – polimorfismos de nucleotídeo único (do inglês, *single nucleotide polymorphisms*)
- TCR – receptor de célula T (do inglês, *T cell receptor*)
- TH – T *helper*
- TNF – fator de necrose tumoral (do inglês, *tumor necrosis factor*)
- VCAM-1 - molécula de adesão celular vascular-1 (do inglês, *vascular cell adhesion molecule-1*)
- VLA – antígeno muito tardio (do inglês, *very late antigen*)
- WT – controle (do inglês *wild type*)

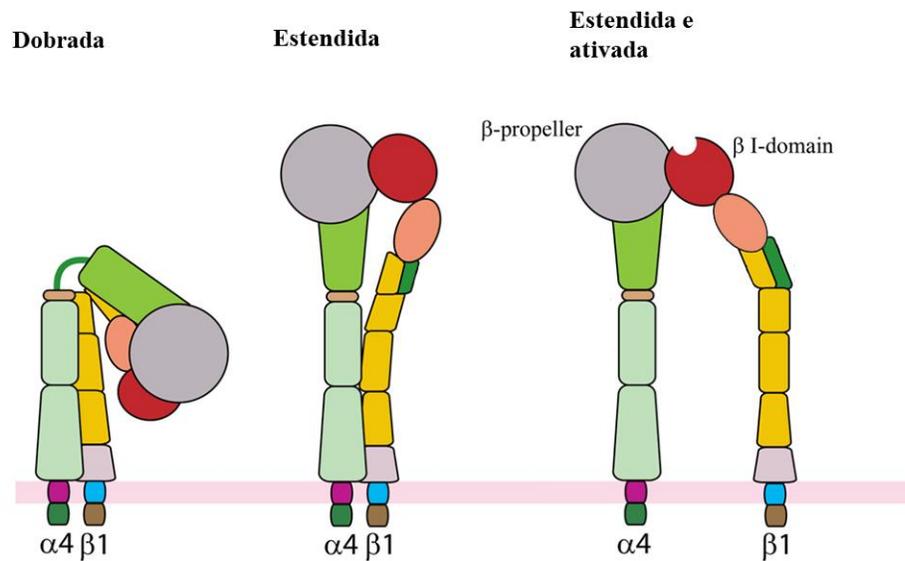
## INTRODUÇÃO

As integrinas são uma família de receptores de superfície celular com papel central na adesão intercelular e à matriz extracelular. Dessa forma, exercem funções essenciais em processos fisiológicos e patológicos. As integrinas são constituídas por duas subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ . Em mamíferos, são encontradas 19 subunidades  $\alpha$  e 8 subunidades  $\beta$ , que se combinam para formar 25 heterodímeros diferentes (1,2). Além disso, essas moléculas podem ser divididas em classes de acordo com os seus ligantes: receptores da sequência tripeptídica (RGD), receptores de colágeno, receptores de laminina e receptores específicos de leucócito (3). Esses receptores permitem a transdução de sinais bidirecionalmente, de fora para dentro (sinalização *outside-in*) e de dentro para fora (sinalização *inside-out*). A interação com biomoléculas resulta na alteração da conformação estrutural das integrinas, assim permitindo uma maior afinidade aos seus ligantes naturais (4). Essas proteínas são capazes de ativar diversas vias de sinalização intracelulares, modulando diferentes processos biológicos, como a proliferação, a sobrevivência e a morte celular, a diferenciação e a expressão gênica. Por exemplo, as integrinas medeiam sinais que podem bloquear a apoptose de células normais pelas vias das proteínas PI3-quinase e Akt, enquanto estimulam a progressão do ciclo celular pela via de Erk (3). Em particular, devido à sua participação na transmigração leucocitária, a integrina VLA-4 tem sido utilizada como alvo do biofármaco natalizumabe. Esse anticorpo monoclonal foi o primeiro antagonista seletivo para a subunidade  $\alpha 4$  das integrinas (5). Esse medicamento, comercializado com o nome de TYSABRI<sup>®</sup>, é indicado para o tratamento de esclerose múltipla e doença de Crohn (6). Entretanto, não há uma correlação clara entre a estrutura molecular da proteína e o seu papel biológico determinado pelos mecanismos moleculares que podem ser desencadeados devido a sua inibição ou ativação. Nesse contexto, a predição e o entendimento dos efeitos oriundos de variações genéticas tem sido muito importante para a seleção de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em estudos genéticos e para o entendimento de bases moleculares de doenças (7). Os SNPs são as variações genéticas mais comuns em humanos, as quais se caracterizam por um sítio onde existe a alternância de duas bases nucleotídicas em uma frequência de  $>1\%$ , em uma população (8). A distribuição e função dos SNPs são importantes para diversas áreas de pesquisa, podendo afetar as funções do DNA, do RNA e das proteínas. SNPs podem ser classificados como não-codificantes ou codificantes, sendo estes divididos em sinônimos ou não-sinônimos. Os SNPs não-sinônimos são responsáveis por alterações nas sequências de aminoácidos e, assim, a função da proteína apresenta probabilidade de ser comprometida e contribuir para o desenvolvimento de uma doença por suscetibilidade genética (7). Em particular, um estudo em eslovacos demonstrou uma associação entre a alta frequência da alteração 3061(A/G) no gene da subunidade  $\alpha 4$  da VLA-4 em pacientes com esclerose múltipla (EM). Assim, essa variante

polimórfica foi considerada como um fator genético de risco relacionado à doença (9). O banco de dados de SNP (dbSNP) estabelecido pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information), fornece um denso catálogo de SNPs (10). O dbSNP possui mais de 30.000 SNPs para os genes responsáveis pelas duas subunidades do VLA-4, *ITGA4* e *ITGB1*. A avaliação de SNPs não sinônimos utilizando métodos computacionais e *in vitro* permite a caracterização da relação entre as variações genéticas observadas no gene *ITGA4*, que codifica a cadeia  $\alpha 4$  de VLA-4, e as consequentes modificações estruturais e funcionais da sua proteína. Essas abordagens permitem, assim, que identifiquemos as alterações que impliquem em prejuízos nas funções biológicas de VLA-4.

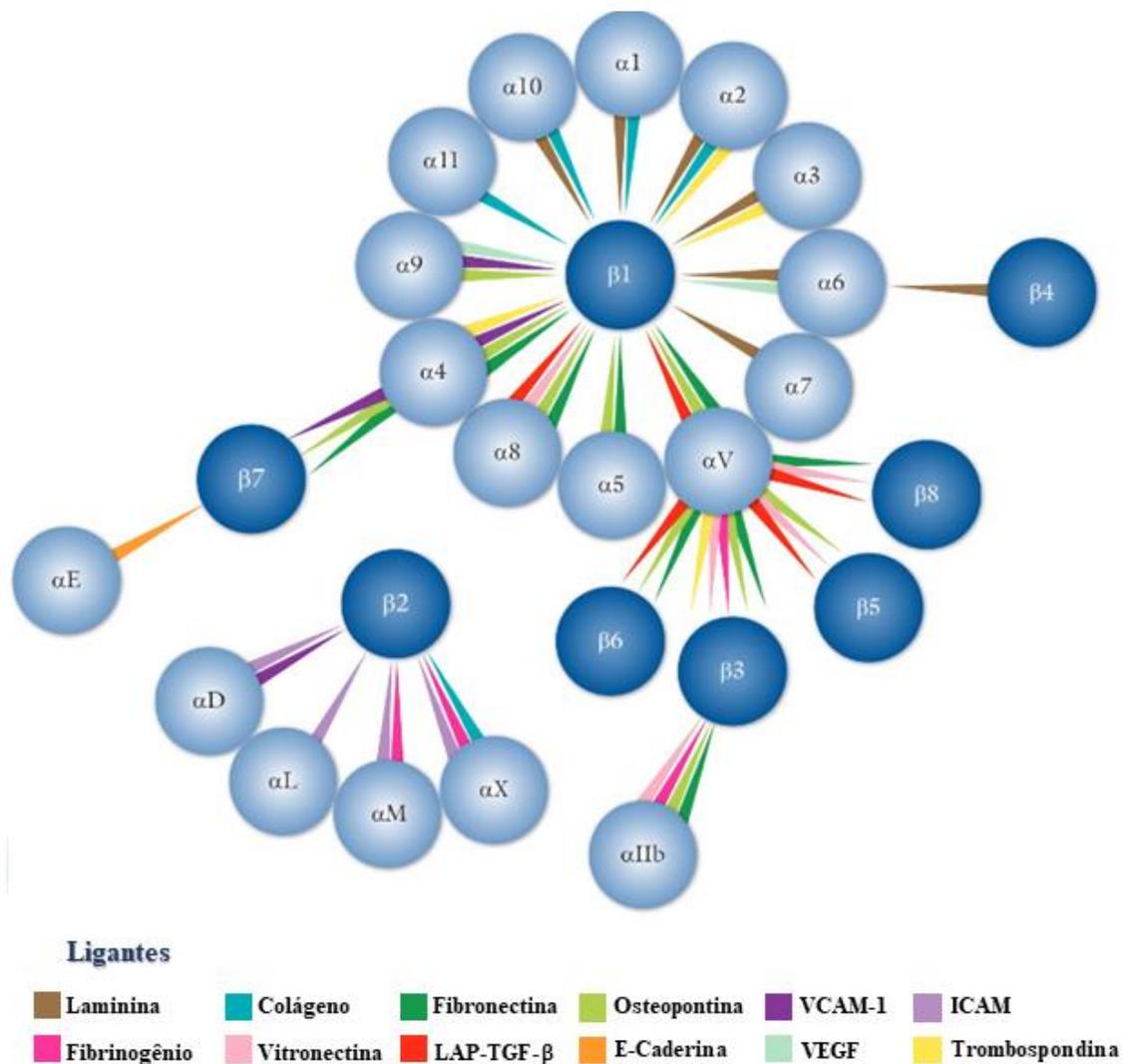
## 1 Estrutura das integrinas

As integrinas são constituídas pela associação não-covalente de duas subunidades glicoproteicas transmembranares,  $\alpha$  e  $\beta$ . A subunidade  $\alpha$  tem o seu tamanho entre 120 e 180 kDa, já a subunidade  $\beta$  varia entre 90 a 110 kDa. Essas proteínas são expressas em diferentes tipos celulares e a maioria deles expressa uma combinação diversificada desses receptores (2). Na maioria das integrinas, cada subunidade possui uma porção extracelular, uma região transmembranar e uma região citoplasmática curta, contendo no máximo 50 aminoácidos (2). A região N-terminal da cadeia  $\alpha$  das integrinas possui sete domínios extracelulares de aproximadamente 60 aminoácidos e tem seu dobramento conformacional em um domínio  $\beta$ -propeller (11). Aproximadamente a metade das  $\alpha$  integrinas possui um domínio de quase 200 aminoácidos, conhecido como domínio I ou fator A de von Willebrand. O domínio I se encontra entre os folhetos  $\beta$  do domínio  $\beta$ -propeller (11). Uma região chamada de MIDAS (do inglês, *Metal Ion-Dependent Adhesion Site*) no domínio I, normalmente possui um íon  $Mg^{2+}$ , e se liga a resíduos carregados negativamente (12). Nas integrinas restantes, que não possuem o domínio I, o domínio  $\beta$ -propeller é responsável pela interação ao ligante (1). Três conformações das integrinas são bem estabelecidas. A primeira é a fechada que não é reconhecida, presumidamente, por nenhum anticorpo ou outra proteína. Na conformação intermediária a integrina se apresenta fechada, porém estendida. Na última conformação a integrina se encontra ativa, aberta e estendida (Figura 1) (13).



**Figura 1. A estrutura da integrina VLA-4.** Representação esquemática de três diferentes conformações da integrina  $\alpha 4\beta 1$ . A conformação dobrada que não existe reconhecimento de ligante (esquerda). A conformação estendida que pode deixar exposto seu sítio de ligação (meio). A conformação estendida e ativada resultando na separação de suas caudas citoplasmáticas (direita). **Fonte:** modificada de SR Barthel et al., 2007 (13).

Integrinas distintas possuem ligantes e especificidades diferentes (Figura 2). De forma geral, é interessante notar que cada integrina possui mais de um ligante e cada ligante interage com mais de uma integrina (2). A maioria dos ligantes compreende proteínas de matriz extracelular envolvidas na adesão ao substrato. Entretanto, existem ligantes que podem mediar agregação ou adesão entre células, como é o caso do fibrinogênio e de proteínas da família das imunoglobulinas (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1) (2). A sequência Arginina-Glicina-Aspartato (RGD) é importante no reconhecimento molecular durante a adesão celular. Ela está presente em proteínas extracelulares adesivas, como a fibronectina e a vitronectina. Grande parte das integrinas conhecidas reconhece a sequência RGD em proteínas de adesão, como fibronectina, vitronectina, fibrinogênio e laminina. A atividade das integrinas na interação com essas proteínas adesivas pode ser inibida pela presença de tripeptídeos RGD. Eles podem ser utilizados para modular a atividade das integrinas em diferentes contextos biológicos, como migração celular, crescimento, diferenciação e apoptose (14).



**Figura 2. Interações das subunidades das integrinas.** As integrinas são proteínas transmembranares que medeiam adesão celular entre células ou matriz extracelular. As integrinas são heterodímeros constituídos por uma subunidade  $\alpha$  (azul claro) e  $\beta$  (azul escuro). Estão ilustradas 18 subunidade  $\alpha$  e 8 subunidades  $\beta$  e podem formar até 24 combinações. Essas integrinas possuem ligantes específicos. Alguns ligantes dessas proteínas estão representados na figura (abaixo). **Fonte:** Modificado de R&D Systems (15).

A região citoplasmática da maioria das subunidades  $\alpha$  das integrinas possui o motivo proteico GFFKR altamente conservado (Figura 3). Essa sequência de aminoácidos presente nas caudas citoplasmáticas é responsável pela interação entre as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  através de uma ponte salina (4). Uma modificação de um único resíduo de aminoácido nesse motivo é capaz de causar uma alteração no estado de ativação da integrina e afetar assim a migração de leucócitos *in vitro* e *in vivo*. De fato, as integrinas  $\alpha 4\beta 1$  e  $\alpha 4\beta 7$  de linfócitos provenientes de camundongos *knock-in* onde a arginina

citoplasmática foi modificada para alanina ( $\alpha 4$ -R/A<sup>GFFKR</sup>) apresentaram interação exacerbada com seus ligantes devido à ativação constitutiva dessas integrinas (16).

|                                |                                      |
|--------------------------------|--------------------------------------|
| <b><math>\alpha 1</math></b>   | KIGFFKRPLKKKMEK                      |
| <b><math>\alpha 2</math></b>   | KLGFFKRKYEKMTKNPDEIDETTELSS          |
| <b><math>\alpha IIB</math></b> | KVGFFKRNRPPLEEDDEEGE                 |
| <b><math>\alpha 3</math></b>   | KCGFFKRARTRALYEAKRQKAEMKSQPSETERLTDD |
| <b><math>\alpha 4</math></b>   | KAGFFKRQYKSILQEEENRRDSWSYINSKSNDD    |
| <b><math>\alpha 5</math></b>   | KLGFFKRSLPYGTAMEKAQLKPPATSDA         |
| <b><math>\alpha V</math></b>   | RMGFFKRVRRPPQEEQEREQLQPHENGEGNSET    |
| <b><math>\alpha 6</math></b>   | KCGFFKRSDYDDSVPRYHAVRIRKEEREI        |
| <b><math>\alpha 7</math></b>   | KMGFFKRAKHPEATVPQYHAVKIPREDRQQFKEEKT |

**Figura 3. Motivo proteico GFFKR altamente conservado entre subunidades  $\alpha$  de integrinas.** Alinhamento das sequências da porção citoplasmática de subunidades  $\alpha$  de integrinas, ressaltando a região GFFKR (em rosa).

## 2 Integrinas na Resposta Imune

O processo de adesão celular necessita da interação de diversos ligantes e receptores e é fundamental para o desenvolvimento de funções imunes, como o endereçamento (do inglês, *homing*) para tecidos linfoides regionais, além da migração transendotelial e a haptotaxia de linfócitos em proteínas de matriz extracelular de tecidos periféricos (17). Além disso, a rápida chegada dos leucócitos aos sítios inflamatórios ou linfonodos determina o êxito na resposta imune (18). Nos linfonodos ocorre a interação entre APCs (do inglês, *antigen-presenting cells*), residentes ou migratórias, e as células T, o que dá início à resposta imune adaptativa (19). A maioria dos linfócitos *naïves* que entra em um órgão linfoide não detecta seu antígeno específico apresentado por APCs. Assim, após um período de 12-18 horas para as células T ou de cerca de 24 horas para células B, os linfócitos retornam à circulação em direção ao próximo órgão linfoide (20). Por sua vez, neutrófilos e monócitos circulam pelo sangue até serem direcionados aos sítios inflamatórios por moléculas atrativas produzidas localmente. Tais células servem também como um sistema de alarme para os linfócitos previamente ativadas nos linfonodos próximos. Diversos desses processos celulares associados à resposta imune são dependentes de integrinas (18). De forma geral, as integrinas presentes na superfície dos linfócitos não são constitutivamente ativas. Elas tornam-se ativadas após estimulação de outros receptores, como receptores de quimiocinas ou receptores antígeno-específicos, o que aumenta a capacidade adesiva das

células. A regulação da afinidade das integrinas é feita pela sinalização *inside-out*, onde sinais intracelulares alteram a conformação e, conseqüentemente, a avidéz da ligação das integrinas presentes na superfície celular (21).

O recrutamento dos leucócitos presentes no sangue é uma das respostas celulares mais importantes no contexto da inflamação ou injúria do tecido. O extravasamento de leucócitos é perfeitamente regulado por mecanismos de reconhecimento seletivo envolvendo as células endoteliais. Esse reconhecimento requer pelo menos três eventos sequenciais. Durante o primeiro passo, os leucócitos aderem de maneira transiente e reversível ao endotélio, coordenado por interações dirigidas por selectinas. O próximo estágio é mediado por quimiocinas específicas que são capazes de ativar os receptores de adesão secundários, as integrinas  $\alpha 4\beta 1$  e  $\alpha L\beta 2$ . Por fim, a interação entre essas moléculas resulta em uma forte ligação, assim finalizando o processo de reconhecimento (22). As quimiocinas produzidas no processo inflamatório, TNF e IL-1, induzem as células endoteliais a expressarem E- e P-selectinas, assim como VCAM-1 e ICAM-1. TNF e IL-1 também são responsáveis por estimularem a secreção de CXCL1 e CCL2 que são capazes de aumentar a afinidade de integrinas presentes nos leucócitos aos seus ligantes (23). As quimiocinas MIP-1, IL-8 e MCP-1 convertem as integrinas inativas para estados de conformação ativa. Os receptores de quimiocinas são receptores acoplados à proteína G e são conhecidos por ativarem PI3-quinase e integrinas (24). A adesão mediada por integrinas é crítica tanto em processos fisiológicos ou patológicos. Por exemplo, a utilização do anticorpo monoclonal (mAb) L25, que interage com a subunidade  $\alpha 4$  de integrinas, estimula a adesão celular e causa a agregação de células T e B (17).

Por sua vez, a motilidade dos leucócitos dentro dos linfonodos ocorre de maneira independente de integrinas. Isso pode acontecer devido à alta afinidade da integrina para adesão não ser crucial em ambientes sem a tensão de cisalhamento, como ocorre nos linfonodos (18). Entretanto, no *homing* de linfócitos, a integrina  $\alpha 4$  tem papel importante nesse processo, especificamente, na adesão firme das células T às vênulas pós capilares, permitindo a migração transendotelial dos linfócitos nas placas de Peyer (25). Contudo, a expressão de ICAM-1 em células dendríticas maduras é necessária para os contatos antígeno-específicos de longa duração com as células T  $CD8^+$  (do inglês, *cluster of differentiation*). Indicando que a ausência de ICAM-1 nas células dendríticas prejudica a apresentação de antígenos. Os linfócitos T  $CD8^+$  que interagiram com APCs deficientes em ICAM-1 produziram menores quantidades de IFN- $\gamma$  e foram deletados clonalmente após duas semanas. Os contatos entre esses dois tipos celulares são responsáveis por induzir a ativação, proliferação e diferenciação de células T  $CD8^+$  iniciais em linfócitos T citotóxicos (26). Desse modo, a interação entre a molécula de

ICAM-1 presente na célula dendrítica e a integrina LFA-1 nos linfócitos T é crucial para a resposta completa da ativação de células T CD8<sup>+</sup> e o estabelecimento de memória efetiva.

A formação da sinapse imunológica permite que as células T detectem seus potenciais ligantes antigênicos. Nesse evento de interação entre linfócitos T e APCs ocorre o reconhecimento dos peptídeos presentes no MHC (do inglês, *major histocompatibility complex*) da APC pelo TCR (do inglês, *T cell receptor*) dos linfócitos T e a mobilização de moléculas sinalizadoras em uma região conhecida como SMAC (do inglês, *supramolecular activation cluster*). Na célula T é observada a mobilização do complexo TCR, composto por CD3 e cadeias  $\zeta$ , os correceptores CD4 ou CD8, bem como o coestimulador CD28 (27). Além disso, a interação LFA-1/ICAM-1 tem um papel coestimulatório na ativação de células T mediada por TCR (28). Da mesma forma, a VLA-4 é recrutada durante as sinapses imunes dependentes de antígeno juntamente com LFA-1 para a porção periférica de SMAC (p-SMAC). Essa integrina foi observada junto com a cadeia CD3- $\zeta$  em p-SMAC. A subunidade  $\alpha 4$  também parece promover a polarização de células T em Th1 (do inglês, *T helper 1*) em modelos humanos *in vitro* de diferenciação de célula T CD4<sup>+</sup> e ativação de células T por células dendríticas. Assim como em ratos, a inibição dessa proteína levou a uma indução de desvio de resposta Th1 (29), demonstrando assim a importância de  $\alpha 4$  em diferentes processos imunológicos, como na apresentação de antígenos e maturação funcional de linfócitos T.

### 3 Integrinas e Câncer

As integrinas são reguladores de diversas funções celulares essenciais para o estabelecimento, a progressão e a metástase de tumores sólidos (30). Em tumores líquidos, como na ALL (do inglês *acute lymphoblastic leukemia*) recidiva de células precursoras B, a alta expressão de  $\alpha 4\beta 1$  nas células leucêmicas presentes na medula óssea foi associada a uma pior prognose de sobrevida global e livre de eventos (31). Por estarem na superfície de células associadas ao tumor, como as células endoteliais, as células inflamatórias e os fibroblastos, as integrinas também podem influenciar o potencial maligno do câncer ao contribuírem para a proliferação, sobrevivência e migração das células tumorais. Desse modo, as integrinas podem mediar angiogênese, desmoplasia e inflamação (30). Alguns estudos demonstraram a correlação entre os níveis de expressão de integrinas em tumores humanos e a evolução do quadro da doença, como metástase e sobrevivência do paciente. Particularmente, as integrinas  $\alpha \nu \beta 3$ ,  $\alpha \nu \beta 5$ ,  $\alpha 5 \beta 1$ ,  $\alpha 6 \beta 4$ ,  $\alpha 4 \beta 1$  e  $\alpha \nu \beta 6$  foram correlacionadas com a progressão da doença (Quadro 1).

### Quadro 1. Integrinas na progressão do câncer.

| Tipo de Tumor                    | Integrinas expressas                  | Fenótipos associados   |
|----------------------------------|---------------------------------------|--|
| Melanoma                         | $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$ | Crescimento de fase vertical (32–35) e metástase nos linfonodos (34–36)  |
| Mama                             | $\alpha 6\beta 4$ e $\alpha v\beta 3$ | $\alpha 6\beta 4$ - Aumento do tamanho e do grau do tumor (37) e diminuição da sobrevivência (38);<br>$\alpha v\beta 3$ - Aumento da metástase óssea (39–42) |
| Próstata                         | $\alpha v\beta 3$                     | Aumento da metástase óssea (43)  |
| Pancreático                      | $\alpha v\beta 3$                     | Metástase nos linfonodos (44)  |
| Ovário                           | $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$ | $\alpha 4\beta 1$ - Aumento da metástase peritoneal (45);<br>$\alpha v\beta 3$ - Aumento da proliferação tumoral (46)  |
| Cervical                         | $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 6$ | Diminuição da sobrevida de pacientes (24, 25)  |
| Glioblastoma                     | $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$ | As duas são expressas no tecido saudável circundante e possuem papel em uma possível invasão (49)  |
| Pulmão (de células não-pequenas) | $\alpha 5\beta 1$                     | Diminuição da sobrevida de pacientes sem presença de tumor nos linfonodos (50)   |
| Cólon                            | $\alpha v\beta 6$                     | Diminuição da sobrevida de pacientes (51)  |

Fonte: modificado de Desgrosellier e Cherech, 2015 (30).

As integrinas também parecem possuir a capacidade de comunicação cruzada com oncogenes específicos. A FAK (do inglês, *focal adhesion kinase*), componente essencial da sinalização de integrinas, é responsável por ativar Ras (do inglês, *rat sarcoma*) e PI3K (do inglês, *phosphatidylinositol 3-kinase*). O silenciamento de FAK em células de tumor mamário de rato, transformadas através da ativação de Ras, resultou na perda da sua competência invasiva. Além disso, células cancerosas humanas, que foram silenciadas para FAK e possuíam a ativação da via de

sinalização Ras ou PI3K alterada por mutações oncogênicas devido à expressão da proteína PyMT (do inglês, *membrane-attached protein*), também apresentaram o mesmo comportamento. Isso sugere a existência de uma relação de dependência entre oncogenes e cascatas de sinalização de integrinas (52).

As integrinas também foram relacionadas à invasão vascular em células de carcinoma hepatocelular. As células invasivas e não invasivas possuíam o mesmo nível de integrinas  $\alpha 5\beta 1$ , entretanto, nas células invasivas a fosforilação constitutiva do domínio citoplasmático da integrina  $\beta 1$  pela estimulação de TGF- $\beta$  foi relacionada à ativação da integrina e à capacidade invasiva de células tumorais (53). Os membros da família do TGF- $\beta$  (fator de crescimento de transformação- $\beta$ ; do inglês, Transforming Growth Factor- $\beta$ ) são sintetizados complexados a um peptídeo denominado LAP (peptídeo associado à latência). TGF- $\beta 1$ -LAP é um ligante da integrina  $\alpha v\beta 6$ , e a expressão dessa integrina pelas células está relacionada com a ativação espacialmente restrita de TGF- $\beta 1$  (54). A ativação de TGF- $\beta 1$  mediada por  $\alpha v\beta 6$  modulou a transdiferenciação de fibroblastos estromais em miofibroblastos. Consequentemente, o miofibroblastos parecem promover a capacidade invasiva de carcinoma basocelular através de uma secreção exacerbada de fator de cicatrização/fator de crescimento do hepatócito (HGF/SF) (55).

Uma vez que algumas integrinas são consideradas importantes mediadoras na relação entre células tumorais e o microambiente normal, a sua utilização como alvo terapêutico para o tratamento de câncer tem trazido importantes progressos. Por exemplo, as integrinas  $\alpha v\beta 3$  e  $\alpha v\beta 5$  são consideradas importantes mediadoras na relação entre células tumorais e o microambiente no cérebro no glioblastoma, como no processo de angiogênese (49). Dados oriundos de testes clínicos de fase II indicaram uma possível atividade antitumoral do inibidor seletivo das integrinas  $\alpha v\beta 3$  e  $\alpha v\beta 5$ , o cilengitide. Essa atividade foi avaliada em pacientes com diagnóstico recente de glioblastoma com a administração do cilengitide juntamente com temozolomida, um quimioterápico (56).

#### **4 Integrinas e Morte Celular**

A perda do contato célula-matriz extracelular mediado por integrinas causa apoptose, especificamente chamada de *anoikis*. Essa apoptose relacionada à ancoragem da célula foi observada em células epiteliais e endoteliais dissociadas da matriz extracelular (57). Em células epiteliais que tiveram sua interação com a matriz celular interrompida foram identificadas características morfológicas de apoptose, tais como fragmentação nuclear, degradação internucleossômica do DNA e da laminina nuclear. Além disso, não foi observada *anoikis* em células epiteliais que hiperexpressavam o gene *bcl-2*, proteína que bloqueia a apoptose. Desse modo, as interações célula-matriz extracelular tem como função a regulação da apoptose (58). CXCL12 e CXCR4 são outras proteínas importantes

para o desenvolvimento, a homeostase e a metástase tumoral. *In vivo*, especificamente em camundongos, foi observado que a expressão da quimiocina CXCL12 é capaz de induzir *anoikis* em células de câncer colorretal humano, sendo capaz de reduzir a metástase do tumor (59). As integrinas parecem ser imprescindíveis na manutenção de células viáveis, pois células endoteliais, que estavam em *anoikis*, ao interagirem com superfícies recobertas de fibronectina ou anticorpos anti-subunidade  $\beta 1$  mostraram ter seu perfil morfológico normal resgatado (60). Outras proteínas relacionadas à integrina também têm papel na *anoikis*. Por exemplo, a ativação de FAK, normalmente fosforilada após a ativação de integrinas por adesão celular, foi capaz de reverter o cenário de *anoikis* em células epiteliais (61). Da mesma forma, a via de PI3K-AKT controla esse tipo de apoptose. A utilização de PI3K ou AKT ativada foi capaz de resgatar células em *anoikis* (57). As integrinas também podem ativar outra via de sobrevivência, a Ras/Raf/MEK/Erk. As proteínas Raf, Erk1/Erk2 podem fosforilar a proteína Bcl-2, de modo que a apoptose seja suprimida. Além disso Ras também pode ativar PI3K regulando a via PI3K-Akt. Desse modo, integrinas têm sido definidas como componentes críticos para os mecanismos de sobrevivência e morte celular (62).

#### **4.1 Tipos de morte celular**

A morte celular pode ser classificada de acordo com características específicas, como a aparência morfológica (apoptótica, necrótica, autofágica ou associada com mitose), presença de determinadas enzimas (nucleases e proteases), aspectos funcionais (programada ou acidental, fisiológica ou patológica) (63). Segundo o NCCD (do inglês, *Nomenclature Committee on Cell Death*), uma célula pode ser considerada morta quando ela tiver um dos seguintes parâmetros moleculares ou morfológicos: (i) perda da integridade da membrana plasmática; (ii) fragmentação da célula e do seu núcleo em corpos apoptóticos; (iii) fagocitose dos fragmentos ou da célula já morta por células adjacentes *in vivo* (64). O quadro 2 mostra algumas das características morfológicas específicas para cada tipo de morte celular.

## Quadro 2. Diferentes tipos de morte celular.

| Tipo de Morte Celular | Características Morfológicas   |
|-----------------------|--|
| Apoptose              | Arredondamento da célula<br>Retração dos pseudópodes<br>Redução do volume celular e nuclear (picnose)<br>Fragmentação nuclear (cariorrexe)<br>Modificações menores de organelas citoplasmáticas<br>Formação de projeções citoplasmáticas em forma de bolhas ( <i>blebbing</i> )<br>Fagocitose por fagócitos residentes, <i>in vivo</i> |
| Autofagia             | Ausência de condensação da cromatina<br>Vacuolização massiva do citoplasma<br>Acumulação de vacúolos autofágicos com dupla membrana<br>Pouca ou nenhuma fagocitose, <i>in vivo</i>   |
| Cornificação          | Eliminação de organelas do citosol<br>Modificações na membrana plasmática<br>Extrusão de lipídeos no espaço extracelular<br>Perda de corneócito por ação de proteases  |
| Necrose               | Extravasamento citoplasmático (oncose)<br>Ruptura da membrana plasmática<br>Extravasamento de organelas citoplasmáticas<br>Condensação moderada da cromatina   |

Fonte: Modificado de G. Kroemer, R. Knight, L. Galluzzi et al., 2009 (65)

Além da apoptose, são documentadas outras formas de morte celular não-apoptóticas, como autofagia, necroptose, piroptose e ferroptose. Esses tipos de morte podem ser ativados de modo independente ou pela inibição da própria apoptose (66). Além disso, pode ocorrer casos em que a morte celular apresenta características de tipos de morte diferentes, o que leva à utilização de termos como “necroptose” (67).

#### **4.1.1 Necrose**

A necrose é caracterizada morfológicamente pelo aumento de volume celular, extravasamento de organelas, ruptura da membrana plasmática com subsequente perda dos componentes intracelulares (65). Esse processo está presente em condições clínicas, como isquemia, trauma e neurodegeneração. O processo necrótico pode ser iniciado em resposta a lesões. A necrose pode ser caracterizada por alterações mitocondriais, diminuição de ATP, aumento da concentração de cálcio presente no citosol, devido à ruptura da membrana, causando uma sobrecarga e ativação de proteases diferentes das caspases, como as calpaínas e catepsinas. A necrose, normalmente, é definida como uma morte celular que não possui as características de apoptose ou de autofagia. Se observadas individualmente, as moléculas envolvidas no processo necrótico não são exclusivas desse tipo de morte celular (68). Por exemplo, o óxido nítrico que possui funções como neurotransmissor, regulando o peristaltismo intestinal, é capaz de induzir um desvio do processo de apoptose para o de necrose ao inibir caspases ativadas ou sua ativação (69). Acredita-se que a necrose ocorra pela soma desses fatores, que não são específicos a este processo, mas de maneira conjunta são capazes de levar ao desenvolvimento de características peculiares à necrose. Apesar da morte celular por necrose ser considerada um processo sem controle molecular, a inibição de proteínas específicas envolvidas com outros tipos de morte, como as caspases, pode levar à mudança do tipo de morte para necrose (68). A ativação do processo de necrose ocorre de maneira independente de caspases. A proteína FasL é capaz de matar células T ativadas sem a ativação de caspases, resultando em uma morfologia característica de necrose. Em células Jurkat deficientes em FADD ou RIP, receptores da proteína supracitada, não foi observada a morte independente de caspase induzida por FasL. Desse modo, a morte celular mediada por receptores de domínio de morte, como TNFR1, Fas, TRAILR, aparenta depender de duas vias diferentes, a da quinase RIP1 e a da caspase-8 (70).

#### **4.1.2 Autofagia**

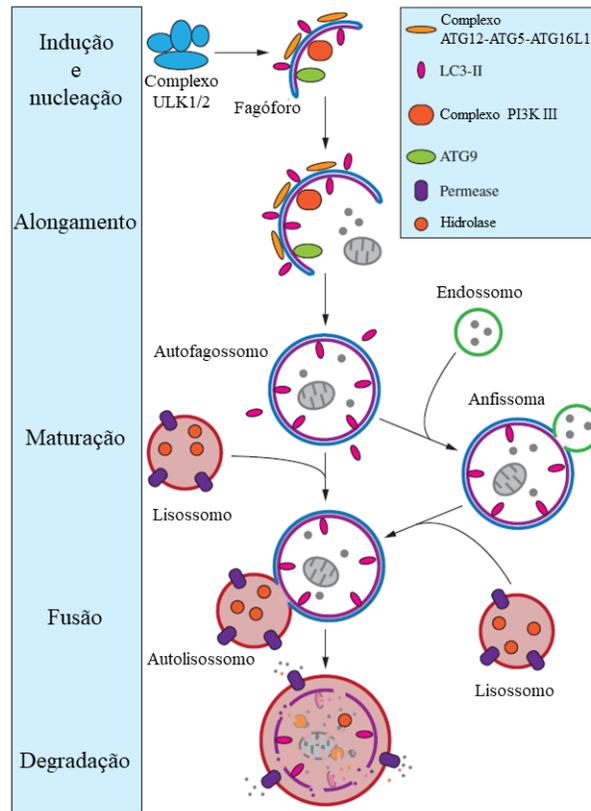
A autofagia é um processo celular responsável pelo sequestro de componentes citoplasmáticos em vesículas com dupla membrana, chamadas de autofagossomos. Essas vesículas são encaminhadas aos lisossomos, resultando na degradação de proteínas e na manutenção de altos níveis de aminoácidos no citoplasma. Esse mecanismo é altamente conservado em eucariotos e essencial para viabilidade celular, podendo ser regulado pela restrição de nutrientes (71). A degradação proteica pela autofagia é uma resposta essencial ao estresse nutricional. Porém, a autofagia também é importante para processos que envolvam o remodelamento celular, como a adaptação da célula a novas condições ambientais. Em

leveduras, por exemplo, a mudança da fonte de carbono leva à rápida degradação dos peroxissomos, em um processo denominado peroxofagia devido a sua semelhança ao processo de autofagia (71,72).

Diferentes processos de autofagia relacionados à privação de nutrientes já foram descritos. Em células de mamíferos, por exemplo, os três tipos mais relevantes são: a autofagia mediada por chaperonas (AMC), a microautofagia e a macroautofagia (73). A AMC é a única via de autofagia que permite a degradação seletiva de proteínas solúveis nos lisossomos sem exigir a formação de vesículas ou maiores mudanças na membrana lisossomal (74). Nela, as proteínas a serem degradadas são direcionadas para a membrana lisossomal pelo reconhecimento de um motivo KFERQ por um complexo de chaperonas no citoplasma (75). Esse complexo é constituído pela proteína HSC70 (do inglês, *heat shock cognate protein*) e suas co-chaperonas. Após esse reconhecimento, a proteína LAMP-2 (proteína 2 de membrana associada ao lisossoma) é responsável por translocar a proteína de substrato para o lúmen do lisossomo. Desse modo, a AMC apresenta seletividade e translocação direta do substrato (74). Já na microautofagia, a fagocitose do citoplasma ocorre pela superfície lisossomal e não existe translocação de proteínas como na AMC (76). Nesse tipo de autofagia, invaginações e protusões da membrana do lisossomo capturam os componentes citosólicos (77).

A macroautofagia, também conhecida como autofagia, é a resposta primária à privação de nutrientes. Durante a autofagia o citoplasma é retido não especificamente em uma vesícula com membrana dupla que se funde ao lisossomo. Em leveduras e plantas, a fusão ocorre com o vacúolo. O conteúdo da vesícula interna, chamado de corpo autofágico, é liberado no lúmen lisossomal levando à degradação do conteúdo por hidrolases. Permeases presentes na membrana do lisossomo permitem a liberação das macromoléculas no citosol para reações anabólicas ou catabólicas (71,78). Assim, macroautofagia consegue sequestrar organelas inteiras e a sua degradação não é limitada por efeitos estéricos. A autofagia é dividida em três estágios distintos: nucleação, alongamento e fusão, Figura 4. Esse processo é controlado pelas proteínas Atg (do inglês, *autophagy related protein*) (79). A formação do autofagossoma se inicia em um sítio perivacuolar, o PAS (do inglês, *phagophore assemble site*). As proteínas Vps34, beclina 1, p150 e Atg14L permitem a formação do PAS (80). Em mamíferos, as proteínas responsáveis pela regulação desse primeiro estágio são PI3K III e mTOR. mTOR inibe a autofagia ao se ligar à Atg1, em mamíferos existem duas proteínas homólogas à Atg1, elas são Ulk1 e Ulk2 (79). Essas proteínas juntamente com FIP200 são necessárias para a formação inicial do autofagossoma. Após a formação do complexo Ulk1/2 e FIP200, a membrana começa a expandir, formando o primeiro compartimento de membrana dupla que será responsável pelo sequestro de moléculas que irão ser recicladas, esse compartimento é chamado de fagóforo. Essa expansão ocorre devido à interação entre as proteínas Atg5, Atg12, Atg10 e Atg7, ocasionando a formação do complexo

juntamente com Atg16L1. A proteína Atg8, ou LC3, é recrutada pelas proteínas Atg7 e Atg10 (81). LC3-II, é a proteína LC3 processada pela Atg4. LC3-II é presente unicamente na membrana do fagóforo, podendo assim ser utilizada para estimar a quantidade de autofagossomas (82). Na fusão, ou maturação, os autofagossomas podem se fundir a um endossomo, formando um anfissoma, antes de se fundir ao lisossomo. O conteúdo do autofagolisossoma é então degradado e exportado para o citoplasma para a posterior reutilização (73).



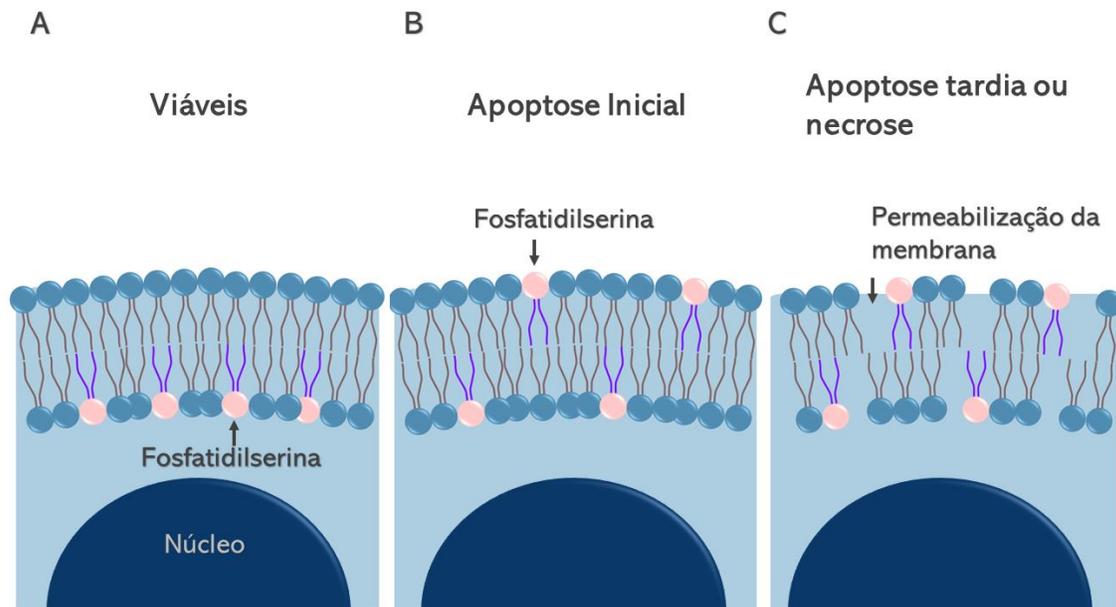
**Figura 4. Morfologia da macroautofagia.** A nucleação do fagóforo ocorre após a indução do complexo ULK1/2. O alongamento do fagóforo é feito pelos complexos ATG12-ATG5-ATG16L1, PI3K de classe III, LC3-II e ATG9. Após a formação do autofagossoma a proteína LC3-II é clivada. A membrana externa do autofagossoma se funde ao lisossomo e então forma o autolisossomo. O autofagossomo pode se fundir a um endossomo formando o anfissoma antes de formar o autolisossomo. Os componentes presentes no autolisossomo são degradados e exportados de volta ao citoplasma para serem reutilizados pela célula. **Fonte:** Modificada de Parzych e Klionsky, 2014 (73).

Por sua vez, a autofagia tem papéis fundamentais no desenvolvimento e na função dos linfócitos. Através do controle de qualidade e renovação mitocondrial, a autofagia regula a homeostase dos linfócitos T naíves e a proliferação nos linfócitos T maduros. Além disso, ela pode levar à morte de linfócitos pela liberação prolongada de citocinas (73). A autofagia pode desempenhar funções não relacionadas à nutrição celular, especialmente em condições patofisiológicas como na supressão de

tumores, eliminação de vírus e bactérias invasoras, apresentação de antígenos, neurodegeneração e miopatias (71). Por exemplo, a autofagia foi identificada como uma rota na qual antígenos citoplasmáticos e nucleares são entregues ao MHC classe II responsáveis pela apresentação de antígenos a células T CD4<sup>+</sup> (83). A hiperexpressão de LAMP-2A, componente da autofagia mediada por chaperonas, resultou em um aumento da apresentação de epítomos de um autoantígeno citoplasmático específico, GAD (do inglês, *glutamate decarboxylase*) em células B humanas (84). A autofagia também é capaz de modular o MHC classe I por estar relacionada à apresentação cruzada de antígenos tumorais e à ativação de células T CD8<sup>+</sup>. A indução da macroautofagia aumentou a apresentação cruzada de um antígeno tumoral, gp100, enquanto a inibição da macroautofagia reduziu a apresentação cruzada desse mesmo antígeno em células T CD8<sup>+</sup>. Essa modulação foi feita utilizando rapamicina, 3-MA (do inglês, *3-methyladenine*) e wortmannin, sendo o primeiro composto inibidor da via mTOR e os dois últimos inibidores da via PI3K. Desse modo, a autofagia tem um papel importante na vigilância imunológica de células infectadas ou tumorais (83).

#### **4.1.3 Apoptose**

As mudanças estruturais morfológicas específicas da apoptose ocorrem em dois estágios diferentes. No primeiro estágio, há a condensação nuclear e citoplasmática, bem como a fragmentação da célula em vesículas (corpos apoptóticos). As características morfológicas desse tipo de morte celular sugerem que esse fenômeno é programado, ativado intrinsecamente e pode ser iniciado ou inibido por diferentes estímulos ambientais, sejam fisiológicos ou patológicos (85). A exposição de fosfatidilserina na superfície externa de células apoptóticas é responsável pelo reconhecimento e pela remoção desses corpos apoptóticos por fagócitos (86). A Figura 5 ilustra a distribuição da fosfatidilserina em membrana plasmática de células viáveis (A), em células em apoptose inicial (B) e em células em apoptose tardia ou necrose (C). Alguns desses corpúsculos esféricos ou ovoides podem conter restos de núcleos picnóticos (64). Na segunda fase, os corpos apoptóticos são eliminados ou absorvidos por outras células (85). Diferente do processo necrótico, a apoptose não estimula o processo inflamatório, pois o conteúdo celular não é exposto ao ambiente extracelular (87). Eventos apoptóticos podem ser normalmente observados na renovação tecidual de adultos saudáveis, no remodelamento de estruturas do desenvolvimento embrionário e durante o envelhecimento de inúmeros órgãos (85).



**Figura 5. Localização da fosfatidilserina na membrana plasmática de células.** Demonstração da distribuição de fosfatidilserina em células viáveis (A); em apoptose inicial (B) e em células em apoptose tardia ou necrose (C).

Molecularmente, a entrada das células em apoptose e a sua subsequente progressão dependem da família das caspases (do inglês, *cysteine aspartate-specific proteases*). Essas proteínas possuem cisteína no seu sítio ativo para o reconhecimento dos seus substratos, clivando sua proteína alvo no resíduo de aspartato. As caspases são expressas na forma de pró-enzima inativa e quando são clivadas podem ativar outras pró-caspases, amplificando assim a cascata apoptótica e levando a uma rápida morte celular. As caspases podem ser divididas em três grupos distintos. O primeiro grupo reúne as caspases iniciadoras, incluindo as caspases-2, -8, -9 e -10. O segundo grupo abrange as caspases efetoras, como as caspase-3, -6 e -7. O último grupo possui as caspases envolvidas em respostas imunes inatas, como as caspase-1, -4, -5 e -11 (87,88). Entretanto, caspases podem estar ativas em células que não estão em apoptose, como linfócitos T ativados (89). Além disso, foi observado que caspases podem estar relacionadas a outras funções não-apoptóticas. Por exemplo, a inibição da ativação de caspases é capaz de impedir a proliferação *in vitro* de células T, indicando assim que essas proteínas são necessárias para a proliferação (90). As caspases não são necessárias para a obtenção do fenótipo apoptótico, as células podem morrer independentemente das suas atividades, em resposta a sinais intrínsecos ou pela ativação de receptores de morte, como Fas e TNFR1. Nesse último caso, o processo é chamado especificamente de necroptose (91).

A apoptose pode ser iniciada por duas diferentes rotas bioquímicas dependentes de ativação da cascata de caspase: a via intrínseca ou mitocondrial e a via extrínseca ou mediada por receptores de superfície. Na via intrínseca, diversos sinais internos podem estar envolvidos, como a alteração dos níveis homeostáticos de cálcio celular, estresse oxidativo ou genotóxico, estresse do retículo endoplasmático e danos no DNA. Essa via é controlada por proteínas da família Bcl-2. Essa família possui mais de 30 proteínas, que podem ser classificadas em antiapoptóticas (p.ex. Bcl-2 e Bcl-XL) e pró-apoptóticas (p.ex. Bax e Bak). As proteínas antiapoptóticas atuam de diferentes maneiras para impedir a entrada da célula em apoptose. Um deles envolve o sequestro de caspases, como observado pela ligação direta de Bcl-XL à pró-caspase-8 e ao complexo Apaf-1/pró-caspase-9 (92). Outra proteína presente na mitocôndria que é liberada durante a apoptose é a Smac/DIABLO. Essa molécula é liberada para o citosol durante a apoptose e é capaz de neutralizar outras proteínas da família das IAPs (do inglês, *inhibitor of apoptosis*), como a XIAP. A Smac/DIABLO ao interagir com XIAP permite que a pró-caspase-9 seja liberada para exercer sua função (93). Esse efluxo de Smac/DIABLO pode ser inibido em células que superexpressam Bcl-2. Dessa forma, a proteína Bcl-2 atua na modulação da apoptose tanto na liberação do citocromo c, como da Smac/DIABLO. Além disso, o processo de liberação da Smac/DIABLO é catalisado por caspases e ocorre após a liberação do citocromo c (94). A ativação de caspase-9 ocorre a partir de sua ligação ao apoptossomo, um complexo multiprotéico formado por sete moléculas de Apaf-1 ligadas a citocromo c e dATP. Quando ativa, a caspase-9 cliva a pró-caspase-3, o que resulta na fragmentação do DNA (95).

Em outro mecanismo, as proteínas da família Bcl-2 previnem a liberação de fatores apoptogênicos provenientes das mitocôndrias para o citoplasma, como o citocromo c e a proteína AIF (fator de indução de apoptose). Desse modo, após a liberação desses componentes a apoptose pode ocorrer pela ativação de caspases, levando à clivagem de inúmeras proteínas, do DNA e à formação dos corpos apoptóticos. Por outro lado, alguns membros proapoptóticos dessa família são responsáveis pela disponibilização das caspases, antes complexadas a antagonistas, e pela liberação de fatores apoptogênicos para o citoplasma, agindo diretamente na permeabilidade da membrana mitocondrial e na liberação de citocromo c, o que ocasiona a ativação de caspases (92).

A via extrínseca inicia a apoptose após interações mediadas por receptores transmembranares e seus ligantes, como TNFRI/TNF e Fas/FasL. Após essa ligação, proteínas adaptadoras são recrutadas para interagir com a porção intracelular dos receptores. A proteína adaptadora FADD é recrutada quando FasL se liga ao receptor Fas. TRADD interage com o domínio intracelular de TNFR1 após a ligação de TNF à porção extracelular do seu receptor e resulta no recrutamento de FADD e RIP (96,97). FADD é capaz de se associar à pró-caspase-8 com posterior formação de DISC (do inglês,

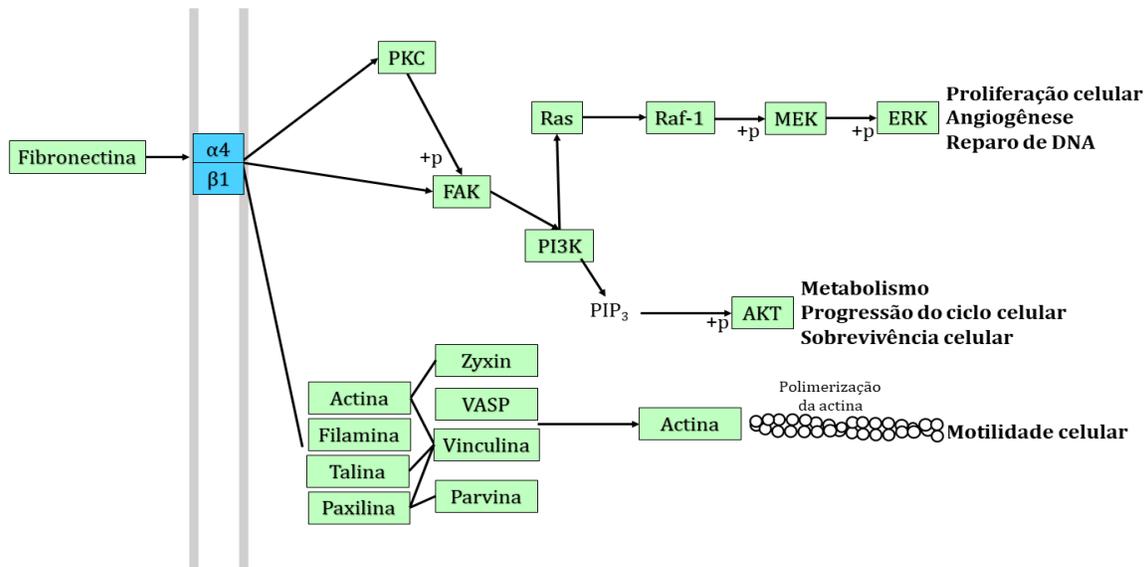
*death-inducing signaling complex*), o que resulta na ativação de pró-caspase-8 que inicia a fase de execução da apoptose (98). Outro regulador negativo de sobrevivência celular mediado por receptores transmembranares seria um processo chamado de “morte mediada por integrinas”. A expressão apenas da porção citoplasmática das integrinas  $\beta 1$  e  $\beta 3$ , não associadas às suas subunidades  $\alpha$ , foi capaz de induzir a morte celular *in vitro*. Também ocasionou o recrutamento da pró-caspase-8 para a membrana e sua ativação de maneira independente de receptor de morte. Desse modo, é possível relacionar integrinas com a morte celular. Aparentemente, a interação entre as subunidades da integrina, especificamente  $\beta 1$  e  $\beta 3$ , inibe esse complexo integrina-caspase, aumentando a sobrevivência celular (99).

## 5 VLA-4

A VLA-4 (do inglês, *Very Late Antigen-4*) é uma integrina da família  $\beta 1$ , subunidade esta que foi supracitada como relacionada à sobrevivência celular. Esta integrina é composta pelas subunidades  $\alpha 4$  (CD49d) e  $\beta 1$  (CD29). Ela participa da ativação de linfócitos T, da adesão endotelial e da migração transendotelial de leucócitos mediadas pela interação com o ligante VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular 1) (100), bem como da ligação à fibronectina, permitindo também que ocorra a migração celular intratecidual (101). O VLA-4 parece estar relacionado com diversas doenças, como a esclerose múltipla (9), diabetes (102) e doença de Crohn (103). Essa integrina é considerada um alvo importante para o tratamento de doenças inflamatórias, como esclerose múltipla e doença de Crohn (6).

### 5.1 VLA-4 e interações

A sinalização *outside-in* ocorre devido à ligação de um ligante aos domínios extracelulares das integrinas, assim induzindo mudanças conformacionais que podem levar a um aumento da afinidade a esse ligante. Posteriormente, sinais podem ser gerados através da alteração de domínios citoplasmáticos da integrina (104). Por exemplo, a integrina VLA-4 possui alguns ligantes naturais, como a fibronectina mostrada na Figura 6. Nessa figura, observarmos as vias de sinalização que podem ser moduladas pela interação da integrina com proteínas da matriz extracelular. Algumas proteínas interagem diretamente com a subunidade  $\alpha 4$ , como fibronectina, VCAM-1 e paxilina, que são descritas a seguir.



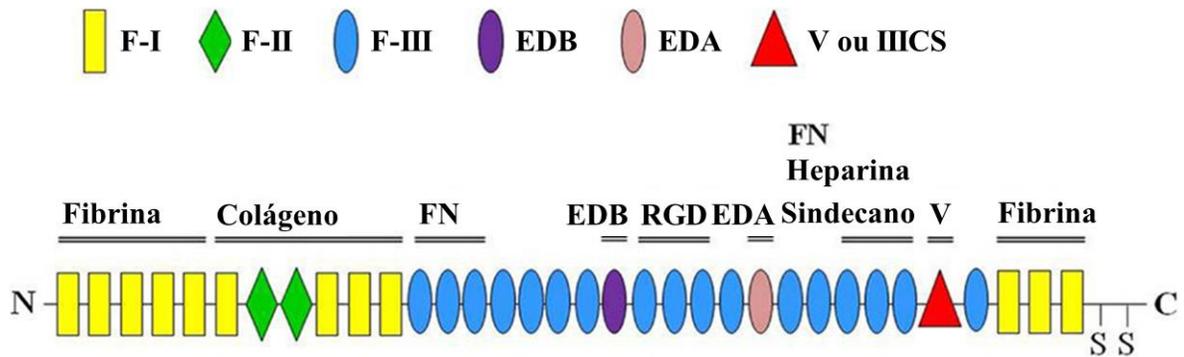
**Figura 6. Vias de sinalização envolvidas à proteína VLA-4.** Diagrama de genes identificados na via de VLA-4 após interação com a fibronectina na porção extracelular. As proteínas que podem ser diretamente ativadas após essa interação são: PKC, FAK, Actina, Filamina, Talina e Paxilina. As vias de sinalização moduladas após ativação de VLA-4 podem ter efeitos diferentes na célula de acordo com as proteínas que interagem com sua porção intracelular. Alguns efeitos dessa interação são a proliferação, o ciclo e a motilidade celular. **Fonte:** Modificada de KEGG Pathway (105).

### 5.1.1 FIBRONECTINA

A fibronectina (FN) é uma glicoproteína adesiva presente na superfície de células, matriz de tecidos conjuntivos e em fluidos extracelulares. Essa proteína é relevante em diversos processos celulares, como a adesão celular, a diferenciação embrionária e a transformação de células cancerosas (106). A expressão dessa proteína ocorre comumente nos tecidos de embriões e de indivíduos adultos. Em processos patológicos, como câncer, fibrose e trombose, sua expressão pode estar alterada. Abordagens genéticas experimentais mostraram que sua inativação gênica resulta em letalidade embrionária. Camundongos com o gene da fibronectina inativado apresentaram defeitos na formação do tubo neural e graves defeitos em tecidos derivados do mesoderma, como miocárdio mais espesso, endocárdio anormal, ausência ou diminuição de células sanguíneas no coração e nenhuma organização da notocorda (107).

A fibronectina é um dímero composto por duas subunidades quase idênticas, de aproximadamente 250 kDa, ligadas covalentemente na região carboxi-terminal por duas ligações dissulfeto. Essa proteína é composta por três tipos de domínios polipeptídios repetitivos, FNI, FNII e FNIII (108). A fibronectina pode ser encontrada em duas formas: plasmática e celular. A fibronectina plasmática possui apenas uma subunidade com o domínio V também não existem os domínios EDA e EDB. A fibronectina celular possui o domínio IIIICS completo, além dos domínios EDA e EDB (109).

A fibronectina possui dois domínios que foram os primeiros a serem relacionados à adesão celular. O domínio IIIICS (*FNIII connecting segment*), onde ocorre ligação com a integrina  $\alpha 4\beta 1$  e  $\alpha 4\beta 7$ , e a região reconhecida pela integrina  $\alpha 5\beta 1$ , constituída pelo tripeptídeo RGD, Figura 7 (110).

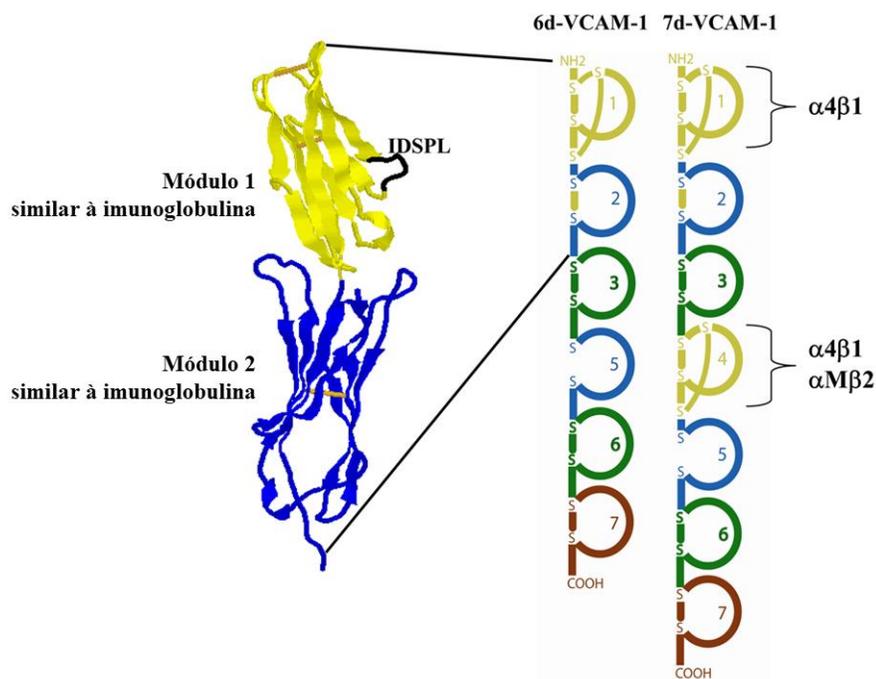


**Figura 7. Estrutura modular da fibronectina celular e seus domínios de interação.** A fibronectina possui três tipos de repetição, I, II e III. Cada domínio possui seus ligantes específicos, como fibrina, colágeno, fibronectina, heparina. EDA, EDB e V representam os sítios de FNIII onde ocorrem *splicing* alternativo. **Fonte:** Modificada de Freire-de-Lima L, 2014 (164).

O domínio IIIICS possui duas regiões dependentes de *splicing* alternativo, CS1 e CS5. CS1 é um peptídeo constituído por 25 resíduos de aminoácidos, sendo reconhecido pela integrina  $\alpha 4\beta 1$ . Esse reconhecimento ocorre pela interação dos aminoácidos EILDVPST presentes em CS1 e desempenha papel essencial na proliferação de células murinas de melanoma. Outros peptídeos, como EILDV e LDVPS, também apresentam atividade modulatória de metástases, permitindo que a célula aderisse e então proliferasse. Em comum entre esses dois peptídeos, a sequência mínima LDV (leucina-aspartato-valina) é capaz de inibir a interação à fibronectina e suprimir a adesão celular (110). A região CS5 do domínio IIIICS está localizada entre os resíduos 90-109 da fibronectina também participa no desenvolvimento de células de melanoma ao ligar a integrina  $\alpha 4\beta 1$ . A sua sequência ativa mínima é composta por arginina-glutamina-aspartato-valina (REDV). Os motivos CS1 e CS5 são reconhecidos por regiões iguais ou sobrepostas da integrina  $\alpha 4\beta 1$ , pois um peptídeo inibe a atividade do outro, indicando um bloqueio estérico ou competição pelo mesmo sítio (111). Além disso, outra região da fibronectina contém uma extremidade C-terminal de ligação com a heparina, chamada de HepII e localizada no domínio FNIII-14. Essa região é homóloga à CS1 e capaz de interagir com  $\alpha 4\beta 1$  (112).

### 5.1.2 VCAM-1

A molécula VCAM-1 (CD106) é essencial para as interações entre leucócitos e células endoteliais ativadas por citocinas durante a migração transendotelial (113). Ela é uma molécula de adesão transmembranar pertencente à superfamília das imunoglobulinas. Essa proteína possui um domínio citoplasmático curto, um domínio transmembranar e pode apresentar seis ou sete domínios extracelulares (114) (Figura 8). VCAM-1 pode interagir com as integrinas  $\alpha 4\beta 1$  e  $\alpha 4\beta 7$  presentes nos leucócitos, o que permite a migração transendotelial. A integrina  $\alpha 4\beta 1$  possui diferentes níveis de afinidade, que são regulados de acordo com sua conformação e taxa de dissociação. A mudança de afinidade de VLA-4 ao VCAM-1 é controlada pela presença de cátions divalentes, como  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , e  $Ca^{2+}$  (115). Dos sete domínios presentes em VCAM-1, a integrina possui dois sítios de ligação funcionais às regiões do primeiro (D1) e do quarto (D4) domínio (116). O motivo proteico ácido QIDSPL de VCAM-1 é essencial para a interação com o sítio de ligação de VLA-4. A ligação ao domínio D4 só ocorre após uma ativação prévia de VLA-4, o que não é necessário para a interação de D1 à subunidade  $\alpha 4$  de integrinas (117).



**Figure 8. Estrutura das formas de VCAM-1.** Esquema da estrutura de VCAM-1 e suas duas isoformas. É composto por dois módulos, um em amarelo e outro em azul. No módulo 1 existe o *loop* IDSPL que é reconhecido pela integrina  $\alpha 4\beta 1$ . O fragmento IDSPL no módulo 2 também é reconhecido pela integrina  $\alpha M\beta 2$ . **Fonte:** SR Barthel et al., 2007(13)

### 5.1.3 PAXILINA

A paxilina é uma proteína adaptadora encontrada no citoplasma, participando da formação de um complexo de adesão focal com outras proteínas, como FAK e Src. Essas interações moleculares possibilitam a adesão celular mediada por integrinas. Nela, a porção citoplasmática da subunidade  $\alpha 4$  da integrina se liga diretamente à paxilina. Uma região conservada constituída por nove aminoácidos presentes na integrina  $\alpha 4$  é suficiente para que ocorra a interação entre as duas proteínas. Alterações nesse sítio são responsáveis por modificações na migração e no espalhamento das células. Por exemplo, a sequência entre Ala<sup>176</sup>- Asp<sup>275</sup> é suficiente para a ligação à subunidade  $\alpha 4$  da VLA-4. A interação da paxilina à cauda da subunidade  $\alpha 4$  é um evento que resulta no aumento da migração celular e a inibição dessa interação pode ser capaz de bloquear seletivamente algumas respostas celulares dependentes dessa subunidade (118).

## 6 Abordagem de bioinformática para estudos de estrutura-função

Estratégias *in silico* apresentam vantagens competitivas às pesquisas para o desenvolvimento ou produção de novos medicamentos por serem utilizados como uma maneira de permitir que esse processo seja acelerado e mais acessível economicamente. Além disso, se adaptam à Diretiva da União Europeia de 2010, que determinou a aplicação do princípio dos 3Rs para redução, refinamento e substituição (do inglês, *reduction, refinement, and replacement*) na experimentação animal. O princípio da substituição visa a utilização de métodos que não envolvam o uso de animais, como por exemplo os sistemas *in vitro*; abordagens e métodos baseados em computador, também conhecidos como técnicas *in silico*; além da utilização das “ômicas” (e.g. transcriptômica, proteômica e metabolômica). Desse modo, abordagens alternativas, que estão de acordo com essas medidas, têm sido estimuladas (119). A anotação funcional é a ligação entre informação biológica e uma sequência ou um conjunto de sequências. A anotação genômica pode ser classificada em três níveis diferentes, nucleotídeo, proteína e processos biológicos. O objetivo da anotação é entender a função dos genes e dos seus produtos na célula e na fisiologia do organismo. Entretanto, a falta de utilização de um padrão de anotação dificultou a associação entre genes que foram anotados por diferentes grupos de pesquisa. Desse modo, a criação do Consórcio GO (do inglês, *gene ontology*) formado por bancos de dados de organismos modelos, como o *Saccharomyces* Genome Database, Flybase e o Mouse Genome Database, foi um avanço para interligar todas as informações obtidas até então (120). O GO é, então, um vocabulário padrão para descrever funções de genes eucarióticos. Ele é dividido em função molecular, relacionada à atribuição específica da proteína, processo biológico, tendo em vista a finalidade mais ampla dessa

molécula e, por fim, componente celular, o qual a proteína está localizada. Desse modo, as ontologias padronizadas podem ser aplicadas em diferentes bases de dados e em várias espécies (121). A bioinformática permitiu a integração de conhecimento em bancos de dados de genética contendo mutações associadas a doenças e análises genótipo-fenótipo, tais como Ensemble (<https://www.ensembl.org/index.html>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) e o PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/data/>). Bancos de dados semelhantes também têm sido cruciais em outras áreas do conhecimento, como o alinhamento de sequências de DNA e proteínas, predição de estrutura em função de biomoléculas, simulação de processos biológicos e desenho racional de fármacos. Atualmente, o maior desafio encontrado por muitos pesquisadores é avaliar todos os dados obtidos, visto que a velocidade de aquisição é muito superior a velocidade de interpretação dos mesmos (122).

Outro importante desafio é a demonstração de que uma variante é responsável pelo fenótipo relacionado a uma determinada doença. Nesse sentido, os conhecimentos provenientes da bioinformática estrutural permitem a elucidação de processos biológicos a partir do estudo de estruturas proteicas e de outras biomoléculas e sua associação aos mecanismos moleculares envolvidos. A função biológica de proteínas pode ser inferida a partir da sua estrutural tridimensional, comparando-a com estruturas de proteínas relacionadas ou de uma mesma família proteica (123). A aplicação da comparação estrutural entre proteínas para inferir a função só é possível pela utilização de algoritmos para estimar a similaridade entre duas proteínas. Essa similaridade é avaliada pelo alinhamento dos átomos presentes nas proteínas estudadas, o que gera escores do grau de similaridade entre as biomoléculas (123).

O conhecimento obtido a partir da bioinformática estrutural pode ser aplicado no processo da descoberta de fármacos. O planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD; do inglês, *structure-based drug design*) é segmentado em: 1) escolha de um alvo, 2) avaliação da estrutura do alvo e 3) seleção de compostos líderes (124). Na primeira fase do planejamento é necessária a determinação da proteína-alvo ou do ácido nucléico por três métodos principais: cristalografia de raio-X, ressonância magnética nuclear ou por modelagem molecular. Utilizando algoritmos computacionais é possível posicionar compostos ou seus fragmentos em uma região específica da estrutura. Os ligantes podem ser avaliados de acordo com as interações observadas no sítio específico do receptor, utilizando a técnica de *virtual screening*. Essa técnica utiliza moléculas químicas presentes em bancos de dados e fazem a ancoragem (do inglês, *docking*) dela ao receptor em estudo. A otimização do composto líder pode ser feita com o objetivo de aumentar a potência e esse ciclo pode se repetir até a obtenção de uma molécula específica ao seu receptor (124).

## 7 Abordagens farmacogenômicas

O processo de desenvolvimento de fármacos é um método vagaroso e complicado, demandando muito tempo e dinheiro. Esse estudo é constituído pela descoberta de alvos terapêuticos; desenho e seleção da molécula líder para o alvo selecionado; otimização do composto líder; desenvolvimento da molécula líder; e por fim, a descoberta do medicamento (125). Antes dos testes em humanos, o potencial do fármaco é testado na fase pré-clínica, que é dividida em estudos *in vitro* e *in vivo*. Os estudos clínicos são compostos pela fase I, que tem como objetivo avaliar a segurança e a dosagem do fármaco; a fase II investiga a eficácia e os efeitos colaterais; a fase III monitora os efeitos adversos e a eficácia da droga; e por fim a fase IV, também conhecida como farmacovigilância, avalia a segurança e a eficácia do novo composto (Figura 9) (126). Dos cerca de 30.000 compostos sintetizados, aproximadamente 20.000 (66,7%) vão para estudos pré-clínicos. Dentre esses, apenas 200 (0,67%) seguem para fase I de estudos clínicos, 40 (0,13%) entram na fase II, 12 (0,04%) alcançam a fase III e 9 (0,027%) conseguem ser aprovados pelos órgãos regulatórios (125).



**Figure 9. Esquema do processo de descoberta de um fármaco até após a sua introdução no mercado.** Esquema dos estágios no desenvolvimento de fármacos. São necessários vários ensaios nas diferentes etapas, pré-clínicos e clínicos para a avaliação de eficácia e segurança dos possíveis medicamentos. Após esses testes é necessário o registro do medicamento na Anvisa. Alguns medicamentos já no mercado são controlados pela Anvisa para garantir a segurança do seu uso.

Além dos estudos de biodisponibilidade e bioequivalência, avaliações de segurança e eficácia, os pacientes podem responder de maneira diferente ao mesmo medicamento (127). A farmacogenética é a área da farmacologia que investiga como diferenças herdadas geneticamente podem interferir na resposta aos fármacos. Os exemplos mais conhecidos são os polimorfismos genéticos em enzimas responsáveis pelo metabolismo de drogas, que afetam aproximadamente 30% de todos os fármacos

(128). Por exemplo, pessoas que tem baixo metabolismo possuem uma quantidade inferior de citocromo P450, P450dbl. A análise dos cDNAs provenientes de pessoas que possuíam fígados com metabolismo deficiente identificou três variantes do RNA mensageiro do gene do citocromo P450, produzindo proteínas defeituosas (129).

A possibilidade da análise de perfis de expressão de genes em determinadas células ou tecidos em condições específicas permite a seleção de alvos candidatos. Esses alvos podem ser expressos e utilizados para ensaios de triagem para a identificação de potenciais compostos líder. Após a identificação dos compostos é possível utilizar técnicas de síntese para a geração de bibliotecas com essas moléculas para a sua posterior otimização. Depois da otimização dos compostos selecionados, são feitos os testes de fase pré-clínica do processo de desenvolvimento de fármacos (128,130). Além disso, essas ferramentas permitem, de maneira racional, uma melhor escolha do composto líder e uma previsão para suas posteriores otimizações. A farmacogenômica é uma abordagem genômica ampla para selecionar determinantes genéticos na resposta a fármacos. Possui como objetivo permitir uma terapia específica que tem como alvo grupos de pacientes geneticamente definidos. Assim, essa abordagem pode ocasionar um novo tipo de classificação de tratamentos em nível molecular (128). Em integrinas, os SNPs rs2230395 e rs1187075 no gene *ITGB1* foram associados com uma pior sobrevida geral em pacientes de câncer colorretal chineses que estavam fazendo quimioterapia (131). Além disso, o SNP rs1143676 (+3061A/G) do gene *ITGA4* foi associado à doença de Alzheimer em indivíduos da Eslováquia, com uma mutação pontual gerando duas variantes da subunidade  $\alpha 4$  (132).

## JUSTIFICATIVA

A integrina VLA-4 tem um papel bem definido nos eventos de ativação e migração de células T, com implicação direta nos processos patológicos de algumas doenças, como diferentes tipos de câncer, esclerose múltipla e doença de Crohn. Entretanto, as relações entre a estrutura e as atividades funcionais da integrina VLA-4 em linfócitos T ainda são elusivas. Dessa forma, a investigação do seu papel, particularmente, sua subunidade  $\alpha 4$  em células Jurkat, visa caracterizar a influência de sua ausência nas funções biológicas de linfócitos T. A ausência da subunidade  $\alpha 4$  permite inferir possíveis mecanismos relacionados à atuação de biofármacos antagonistas ao VLA-4 já comercializados. Além disso, também possibilita avaliar as possíveis respostas celulares a serem consideradas ao utilizar essa proteína como alvo terapêutico.

Por sua vez, utilizando ferramentas *in silico*, analisamos a relação entre a estrutura da subunidade  $\alpha 4$  e suas regiões, simulando sua atividade e avidéz com os seus ligantes naturais. A avaliação de SNPs, utilizando métodos de modelagem computacional, possibilitam a caracterização da relação entre as variações genéticas observadas no gene *ITGA4* e potenciais alterações estruturais e funcionais da sua proteína. Nós já detectamos algumas alterações na célula que não possui a expressão dessa subunidade, demonstrando a importância dessa proteína em linfócitos T. Com os nossos resultados nós esperamos descrever possíveis mecanismos moleculares relacionados a essa integrina e relacioná-los à sua função biológica em células T. Assim, esperamos obter mais informações sobre como esse alvo pode ser inibido sem que outras funções celulares essenciais sejam afetadas inespecificamente. Esperamos também contribuir para as distintas aplicações na medicina personalizada, buscando associar a presença de SNPs a possíveis alterações estruturais na integrina VLA-4, e suas potenciais consequências na função de células do sistema imune.

## OBJETIVOS

### Objetivo geral:

Investigar o papel da integrina VLA-4 na biologia de células T, particularmente na sobrevivência celular, assim como simular os efeitos de polimorfismos de nucleotídeo único no gene *ITGA4* nas funções de VLA-4 *in silico*.

### Objetivos específicos:

1. Avaliar o impacto da inativação gênica da subunidade  $\alpha 4$  da integrina em linhagem de leucemia linfoblástica aguda Jurkat ao estresse por privação de soro;
2. Caracterizar o perfil de expressão de duas linhagens Jurkat, selvagem (WT) e *ITGA-KO* utilizando dados provenientes de RNA-Seq;
3. Avaliar a interação de variantes da subunidade  $\alpha 4$ , contendo SNPs de interesse, com seus ligantes naturais por meio de *docking*, utilizando ferramentas *in silico*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Estabelecimento da linhagem celular de Jurkat *ITGA4*-KO

A inativação do gene *ITGA4* da subunidade  $\alpha 4$  da integrina (CD49d) foi realizada pela técnica de CRISPR/Cas9. Para tal, nós recuperamos a sequência gênica de *ITGA4* a partir da versão humana GRCh38/hg38 (Dez. 2013) do banco de dados UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) (133) e desenhamos oligonucleotídeos para atuarem como RNA-guias contra o primeiro éxon do referido gene, utilizando o software "CRISPR Design Tool" (<http://tools.genome-engineering.org/>) (134). A clonagem molecular dos RNA-guias foi feita utilizando o vetor de expressão pSpCas9(BB)-2A-GFP seguindo as instruções descritas por Cong et al. (2013) (135). Os clones plasmidiais corretos foram identificados por PCR de colônia e subsequentemente confirmados por sequenciamento. Em seguida, nós realizamos a eletroporação de células Jurkat utilizando o sistema Neon<sup>®</sup> (Waltham, Estados Unidos, Thermo Fisher Scientific). Após 24 horas de cultivo, nós enriquecemos a população de células positivas para GFP utilizando o sistema MoFlo ASTRIOS (Beckman Coulter). A obtenção das populações celulares clonais foi realizada por diluição limitante em placa de 96-poços. As células GFP<sup>+</sup> foram então expandidas e genotipadas pelo ensaio SURVEYOR (Integrated DNA Technologies) e por PCR. Por fim, caracterizamos as inserções e deleções (indels) dos clones celulares homocigotos por meio de sequenciamento. A perda da subunidade  $\alpha 4$  da integrina foi confirmada por citometria de fluxo.

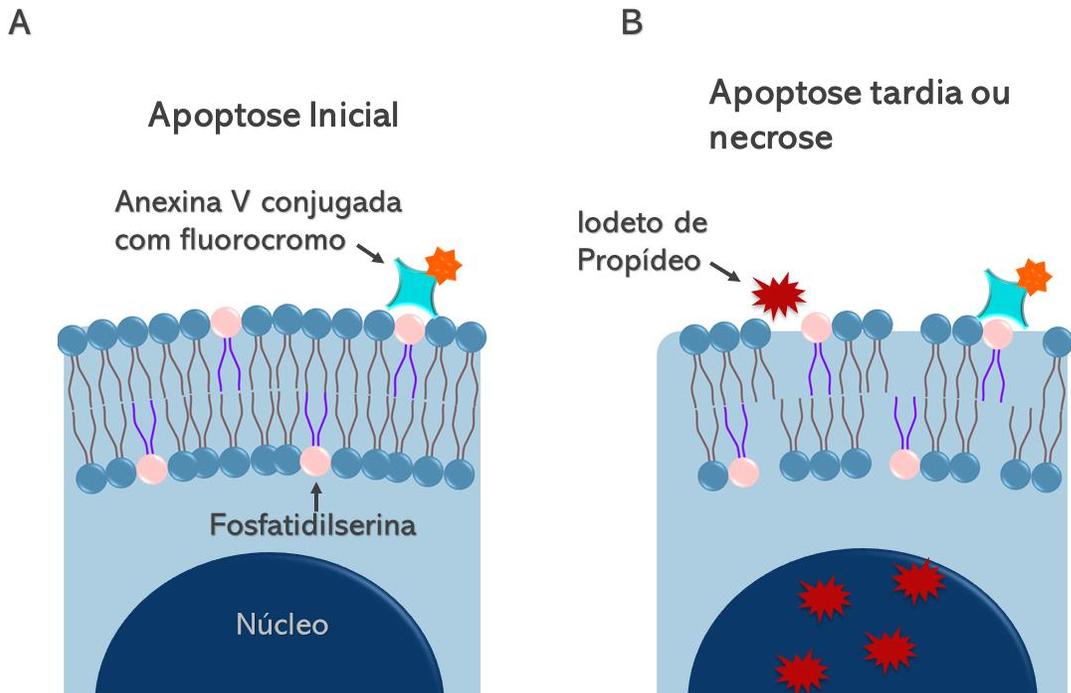
### 2. Caracterização do perfil de expressão de células Jurkat mutantes para *ITGA4*

A linhagem celular Jurkat (células T leucêmicas) foi estabelecida a partir do sangue periférico de um garoto de 14 anos, sendo inicialmente nomeada como JM. Ela expressa o receptor de célula T (TCR), assim como os genes da interleucina-2 e CD3 (136). Em suspensão, essas células apresentam formato arredondado, com a formação de aglomerados. Para estudarmos a função de *ITGA4* na biologia dos linfócitos T, nós utilizamos uma linhagem Jurkat deficiente para a integrina  $\alpha 4$ , obtida em nosso laboratório pela técnica de CRISPR/Cas9. Foi realizado sequenciamento massivo de RNA (RNA-Seq) para comparar os perfis de expressão das células selvagens com as células mutantes. Foram investigados os genes envolvidos em sobrevivência, morte celular e autofagia. As linhagens celulares desse estudo foram cultivadas em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF; Gibco/ThermoFisher Scientific) e os antibióticos penicilina-estreptomicina. Essas células foram mantidas em frascos de cultura estéreis de 25 cm<sup>2</sup> a 37°C, em atmosfera umedecida de 5% de CO<sub>2</sub>. As

células foram repicadas a cada 48 horas em cabine de segurança biológica. Para realizar os experimentos, as células foram centrifugadas com rotação de 400 g por 5 minutos a 21° C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspendido em meio RPMI com 10% de SBF para contagem do número de células. O RNA total de  $5 \times 10^6$  células por amostra (triplicata em cada grupo) foi extraído em TRIzol® e tratado com DNase (TURBO DNA-free™ Kit; Invitrogen/ThermoFisher Scientific). O preparo das amostras foi feito com o kit TruSeq Stranded Total RNA de acordo com as recomendações do fabricante (Illumina, San Diego, CA, USA) e as mesmas foram sequenciadas em sistema de alta vazão NextSeq 500 (Illumina), no Laboratório Nacional de Computação Científica (Petropolis, RJ).

### **3. Avaliação de estresse celular induzida por privação de soro**

Nós avaliamos o impacto da inativação de *ITGA4* na sobrevivência de células Jurkat submetidas ao estresse por privação de soro. Considerando que a fosfatidilserina é exposta na superfície das células durante a apoptose, é possível identificar e quantificar as células em apoptose inicial pela ligação de anexina-V conjugada a fluorocromo (137). Além disso, a utilização do iodeto de propídeo (PI) permite a marcação de células que perderam a integridade da sua membrana (138). A Figura 10 mostra a diferença entre as células em apoptose inicial e em apoptose tarde ou necrose. Desse modo, a marcação conjunta de anexina-V e iodeto de propídeo permite a discriminação das células em três grupos bem definidos: (i) células viáveis; (ii) células em apoptose inicial; (iii) células em apoptose tardia/necrose. Para tal, incubamos  $2,5 \times 10^6$  células selvagens (controle) ou mutantes em 5 mL de meio RPMI-1640 sem soro fetal bovino por 48 horas. Após esse período, coletamos e analisamos metade de cada amostra. As células foram ressuspendidas e incubadas em 100  $\mu$ L de tampão de ligação, contendo 1  $\mu$ L de anexina V::APC e a 4° C durante 15 minutos no escuro. Logo antes da citometria (FACSCanto II, BD Biosciences), nós adicionamos 1  $\mu$ L de iodeto de propídeo por amostra. O restante de cada amostra foi cultivado na presença de soro 10% por mais 48 horas, com posterior avaliação da morte por anexina-V e PI. Em um segundo conjunto de experimentos, as células foram mantidas sem soro por 48 horas e então imunomarcadas para caspase-3 clivada conjugada a PE para avaliação por citometria de fluxo.



**Figura 10. Avaliação de células utilizando Anexina-V e Iodeto de propídeo.** Identificação de células em apoptose inicial (A) e de células em apoptose tardia ou necrose (B).

#### 4. Identificação e predição *in silico* dos efeitos de SNPs em *ITGA4*

Nós fizemos uma busca de SNPs para os genes *ITGA4* (Gene ID: 3676) utilizando o banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). Modificações funcionais de um SNP podem ser estimadas com o banco de dados SNPs3D (<http://www.snps3d.org/>), que permite a identificação de SNPs não-sinônimos. Esses SNPs podem ter um efeito deletério na função molecular proteica. Esse programa associa o genótipo do SNP ao possível fenótipo utilizando dois modelos. O primeiro modelo é fundamentado em SNPs relacionados a doenças, que podem ocorrer devido a um comprometimento da função proteica ao diminuir sua estabilidade. Uma máquina de vetores de suporte (SVM; do inglês, *support vector machine*) é capaz de reconhecer padrões e separá-los entre SNPs relacionados a doenças ou não-deletérios. A distinção dos SNPs entre esses dois grupos é baseada em fatores de estabilidade que sugerem a estabilidade proteica como o maior contribuinte para o desenvolvimento de uma doença monogênica. O segundo modelo avalia a conservação e a classe de resíduos de aminoácidos presentes na sequência da proteína dentro de uma mesma família proteica (139). Nós utilizamos esse servidor para selecionarmos os SNPs não-sinônimos de *ITGA4*. O programa PolyPhen-2 permite a predição do impacto da substituição de aminoácidos na função e estabilidade de proteínas humanas. Essa ferramenta computacional é fundamentada na combinação de informações estruturais e evolutivas. A cada mutação são extraídas várias características baseadas na sequência do local de substituição alimentando um classificador probabilístico. Os possíveis resultados para PolyPhen-2 são fornecidos

por valores variando de 0.0 (benigno) a 1.0 (deletério) (140). No servidor *online*, nós inserimos a sequência proteica da subunidade  $\alpha 4$  em formato FASTA proveniente do banco de dados UniProt (<https://www.uniprot.org/>) e indicamos a posição e a substituição dos aminoácidos de acordo com os SNPs selecionados.

Posteriormente, realizamos a avaliação da interação dos ligantes paxilina, fibronectina e VCAM-1 à subunidade  $\alpha 4$  da integrina e às suas variantes R1007S e S634T. As análises dos efeitos dos polimorfismos de base única foram feitas utilizando modelagem molecular e *docking*. A predição de estruturas proteicas pode ser feita de três maneiras específicas: modelagem comparativa, *threading* e *ab initio*. Para a obtenção da estrutura da paxilina foi utilizado a ferramenta The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para a busca de possíveis moldes a serem empregados na técnica de modelagem comparativa, porém não observamos alinhamentos aceitáveis de acordo com os valores de Query Cover (<30%) obtidos para a sequência do fragmento que nós selecionamos. Desse modo, o modelo desse fragmento foi obtido pelo método de modelagem *ab initio*, utilizando o programa I-TASSER. Da mesma forma, para o segmento IIICS, presente na fibronectina, não foram obtidos dados de similaridade no alinhamento utilizando o Protein BLAST. Assim, esse fragmento também foi modelado utilizando a técnica *ab initio* pelo mesmo servidor. As predições foram realizadas utilizando o servidor Haddock (*High Ambiguity Driven protein-protein Docking*). Por fim, a estrutura do cristal de VCAM-1 foi obtida no banco de dados PDB, cujo código é 1VCA. A estrutura da subunidade  $\alpha 4$  de integrina foi extraída do modelo proteico de VLA-4 cedido pelo Dr. João Hermínio Martins da Silva, da Fiocruz-CE.

Nós analisamos o possível efeito de alteração na função proteica observando a interação entre as variantes contendo os SNPs e os seus ligantes utilizando *docking*. Para as predições e análises dos complexos, nós utilizamos o servidor Haddock (*High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing*). Entre os parâmetros obtidos pelo Haddock, o *Haddock score* é a combinação entre as energias intermoleculares de van der Waals e eletrostáticas de Coulomb e de dessolvatação, assim os menores valores indicam que a interação é energeticamente mais favorável. O *cluster size* designa quantas vezes aquela posição de interação entre as proteínas ocorreu em detrimento de outras posições. O RMSD (do inglês, *Root Mean Square Deviation*) é baseado no desvio médio entre as posições atômicas entre proteínas sobrepostas, sendo influenciado pela interação de ligação e a energia entre a proteína e o seu ligante. Quanto menor esse valor, menor a diferença entre as estruturas, o que indica a qualidade e a confiabilidade do *docking* (141).

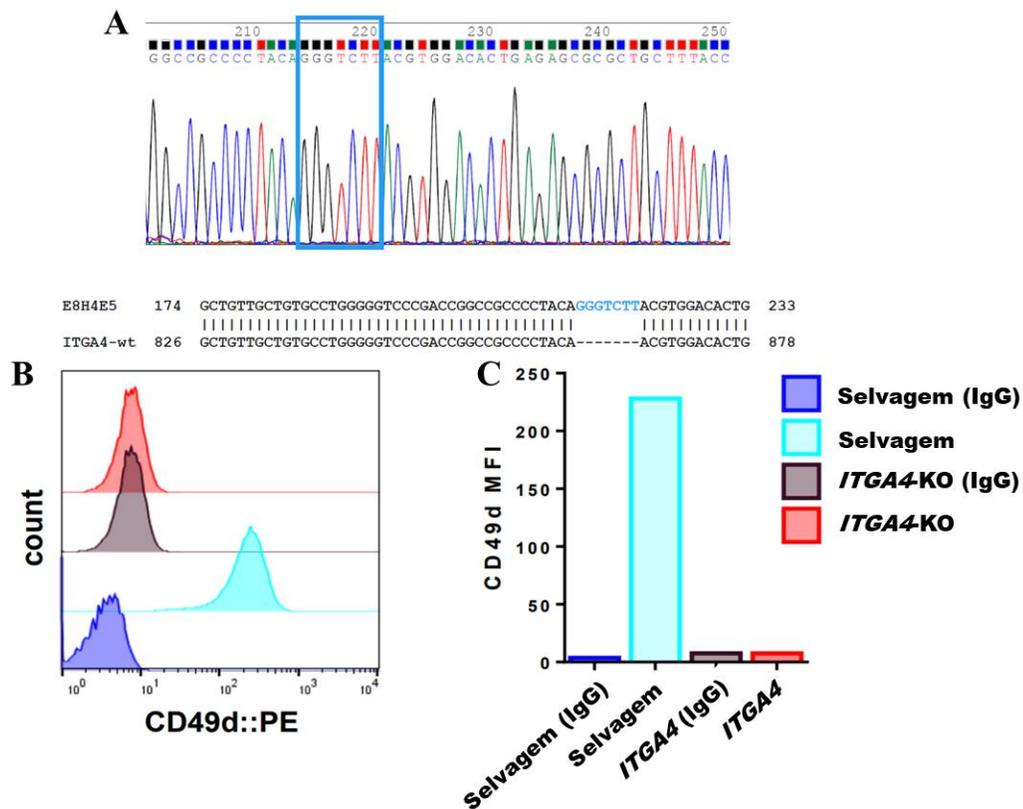
## **5. Avaliação de alterações morfológicas**

As mudanças morfológicas das diferentes linhagens após privação de soro foram avaliadas. Para tal, incubamos  $1 \times 10^6$  células selvagens (controle) ou mutantes em 5 mL de meio RPMI-1640 sem soro fetal bovino por até 48 horas. Após os períodos de 24 horas e 48 horas, coletamos 100  $\mu$ L e então citocentrifugamos em lâminas de vidro e secadas ao ar. As lâminas foram coradas utilizando a técnica de Panótico Rápido LB, baseada na técnica de Romanowsky, para uso hematológico. Esse método emprega um fixador (triarilmetano), um corante ácido (xantenos) e um corante básico (tiazinas) (142). O estudo citomorfológico foi feito por microscópio de luz, observando alterações como condensação da cromatina, perda do volume celular, granulosidade e formação de corpos apoptóticos. Utilizando objetiva de 40X, as imagens de cinco campos diferentes por genótipo foram adquiridas com uma câmera digital CCD. As imagens foram analisadas em software FIJI<sup>®</sup> para contagem de todas as células presentes nas lâminas e quantificação de distintos parâmetros, incluindo tamanho celular e descritores de forma, bem como a presença de núcleos irregulares, picnose ou cariorrexe. As análises estatísticas foram feitas utilizando GraphPad Prism 7.0.

## RESULTADOS

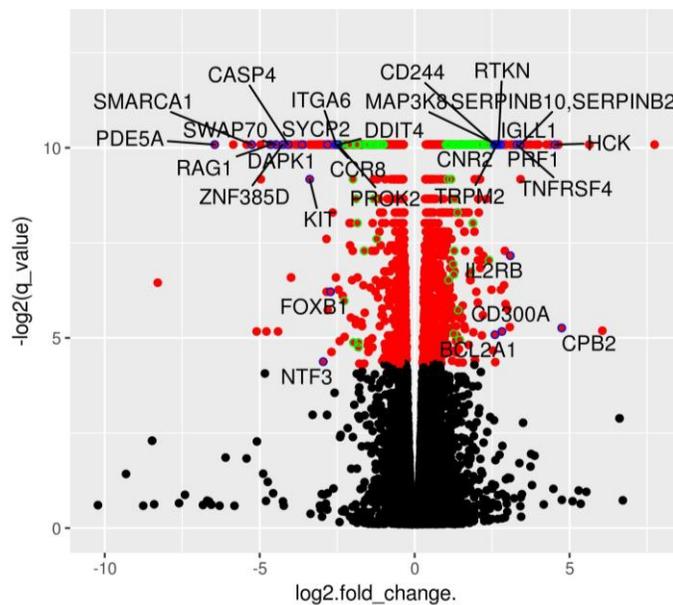
### 1. A inativação da integrina $\alpha 4$ leva a uma alteração do perfil de expressão gênica associado à morte celular

Previamente, nós produzimos e caracterizamos uma linhagem Jurkat mutante para *ITGA4* por CRISPR/Cas9. O sequenciamento dessa linhagem revelou a inserção de sete nucleotídeos, que mudaram a janela de leitura e possivelmente geraram uma proteína truncada. A inativação gênica foi confirmada por citometria de fluxo (Figura 11).

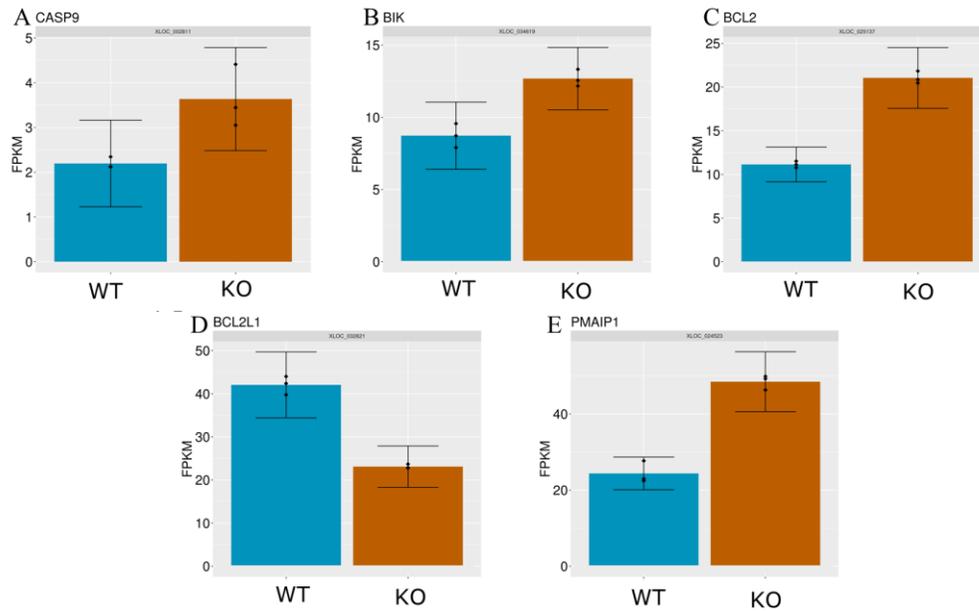


**Figura 11. Deleção da subunidade  $\alpha 4$  em linhagem Jurkat.** (A) Eletroferograma de uma parte da sequência de *ITGA4*. Ressaltado em azul o sequenciamento de DNA de uma inserção de sete nucleotídeos. Comparação dos níveis proteicos de CD49d entre células selvagens e ITGA4-KO, conforme indicado (B e C). (B) Histograma. (C) Gráfico de barras da intensidade mediana de fluorescência (MFI; do inglês, *median fluorescence intensity*). Os gráficos exibem um experimento representativo de três realizados.

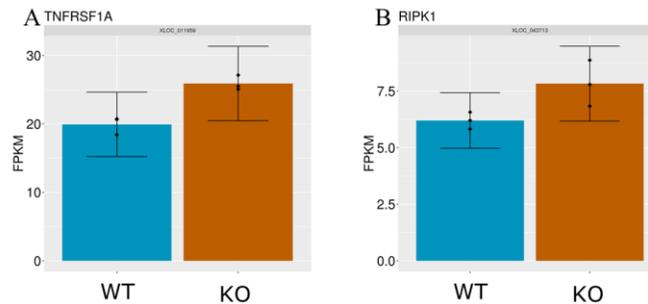
Devido ao sequenciamento massivo de RNAs (RNA-Seq) das células selvagens e mutantes, em condições de repouso, realizamos a caracterização dos processos celulares e mecanismos moleculares influenciados pela integrina  $\alpha 4$ , particularmente na sobrevivência celular. Nós identificamos 443 genes diferencialmente expressos, positivamente ou negativamente, relacionados à morte celular em condições normais de cultivo (Figura 12). Entre eles, observamos modulação significativa de genes relacionados às vias apoptóticas intrínseca (Figura 13) e extrínseca (Figura 14), selecionados a partir do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (143). Em particular, os genes pró-apoptóticos *CASP9*, *BIK* e *PMAIP1* tiveram os seus níveis de expressão aumentados na linhagem celular deficiente para o gene *ITGA4*, assim como o gene inibidor de morte celular, *BCL2* (Figura 13A-C, E). Entretanto, o gene da proteína BCL-xL (*BCL2L1*), que é antiapoptótica, foi menos expresso nas células deficientes para *ITGA4* (Figura 13D). Já na via extrínseca, nós vimos que os genes do receptor de TNF (*TNFRSF1A*) e de Rip (*RIPK1*) foram modulados positivamente nas células deficientes (Figura 14A, B). Nós observamos que os níveis de expressão da caspase-9 iniciadora aumentaram nas células mutantes (Figura 14A), enquanto a caspase-3 efetora foi menos expressa nessa mesma linhagem em relação à linhagem WT (Figura 15A). Entre as caspases inflamatórias, a caspase-4 também apresentou menor expressão na linhagem *ITGA4-KO* (Figura 15B).



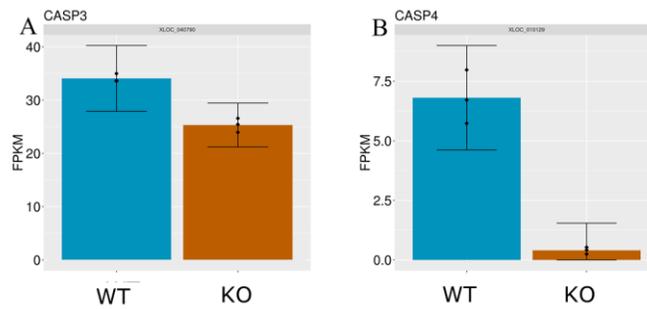
**Figura 12. Gráfico tipo vulcão (volcano plot) de genes diferencialmente expressos entre linhagens de jurkat selvagem x deficiente em *ITGA4*.** Transcriptoma de células Jurkat selvagem (WT) e células deficientes em *ITGA4* (KO). O eixo X mostra diferença entre os grupos, indicando genes regulados positivamente ou negativamente. Os genes relacionados a morte celular estão marcados em verde ou em azul, enquanto os genes que não apresentaram variações significativas estão marcados em preto. Estão em vermelho os genes que apresentaram variações significativas com padj (do inglês, *p-value adjusted for multiple testing*)  $< 0.5$ .



**Figura 13. Expressão diferencial de genes da via apoptótica intrínseca.** Gráficos em barra representam os níveis de RNAm em Jurkat selvagem (WT) e Jurkat deficiente em *ITGA4* (KO) dos genes (A) *CASP9*, (B) *BIK*, (C) *BCL2*, (D) *BCL2L1* e (E) *PMAIP1*. As linhas centrais indicam as médias e as barras de erro indicam o erro padrão de um experimento feito em triplicata. FPKM = *fragments per kilobase of exon per million fragments mapped*.



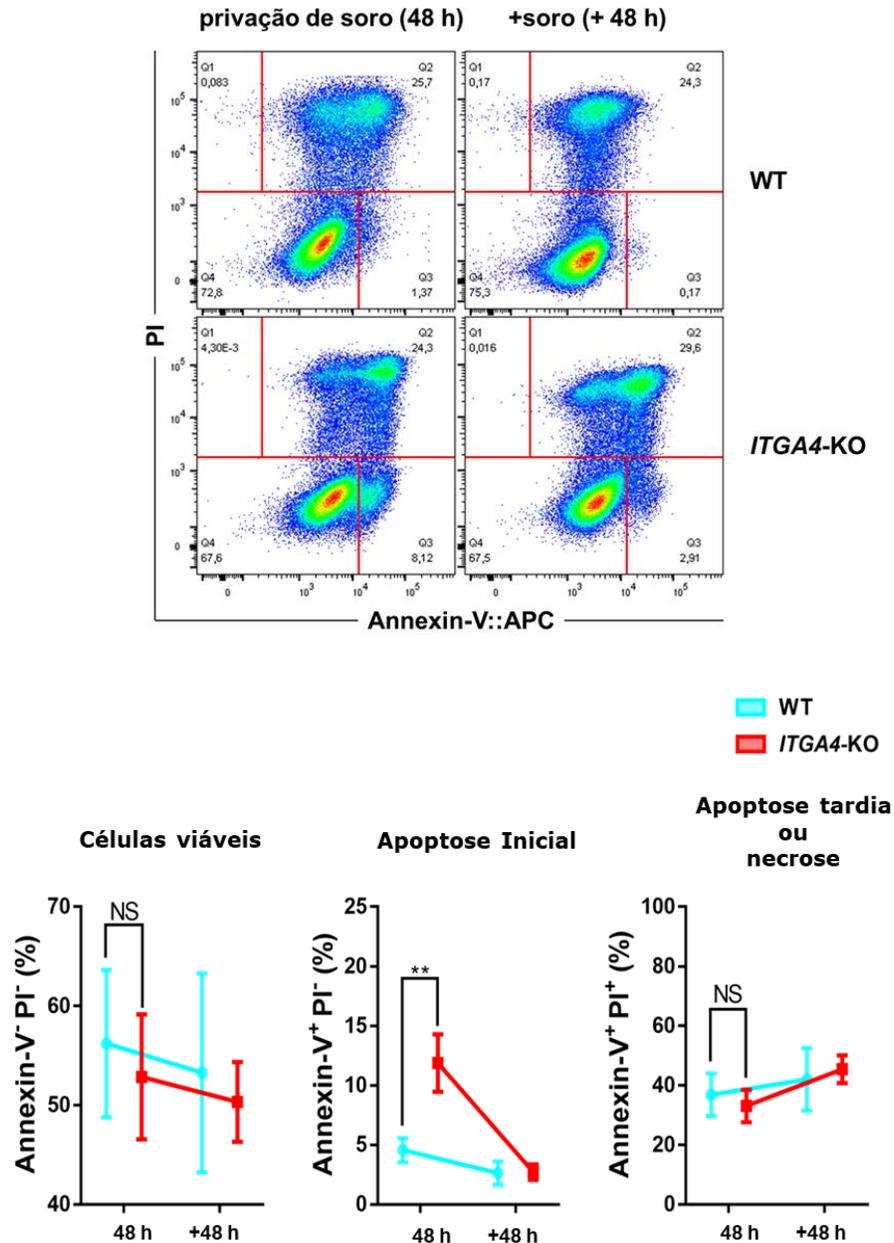
**Figura 14. Expressão diferencial de genes da via apoptótica extrínseca.** Gráficos em barra representam os níveis de RNAm em Jurkat selvagem (WT) e Jurkat deficiente em *ITGA4* (KO) dos genes (A) *TNFRSF1A* e (B) *RIPK1*. As linhas centrais indicam as médias e as barras de erro indicam o erro padrão de um experimento feito em triplicata. FPKM = *fragments per kilobase of exon per million fragments mapped*.



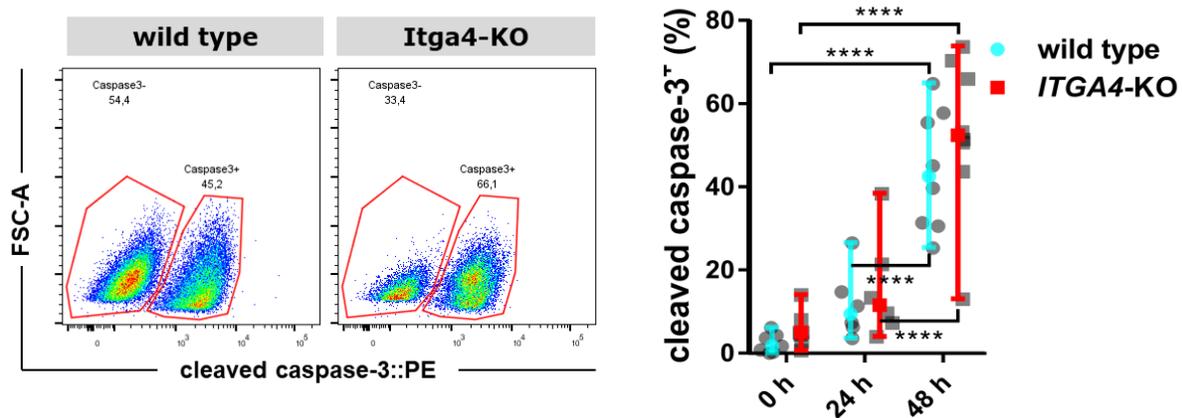
**Figura 15. Expressão diferencial dos genes casp3 e casp4.** Gráficos em barra representam os níveis de RNAm em Jurkat selvagem (WT) e Jurkat deficiente em *ITGA4* (KO) dos genes (A) *CASP3* e (B) *CASP4*. As linhas centrais indicam as médias e as barras de erro indicam o erro padrão de um experimento feito em triplicata. FPKM = *fragments per kilobase of exon per million fragments mapped*.

## 2. Células mutantes para *ITGA4* são mais suscetíveis à apoptose sob condições de estresse por privação de soro

Uma vez que identificamos diversos genes associados à morte celular sendo diferencialmente expressos nas células mutantes para *ITGA4*, nós cultivamos as células selvagens (controle) e mutantes em meio RPMI-1640 sem soro fetal bovino para avaliarmos a função de *ITGA4* na regulação dos diferentes mecanismos moleculares associados à morte celular. Assim, nós observamos que as células mutantes submetidas ao estresse por privação de soro por até 48 horas apresentaram frequência da subpopulação anexina-V<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> cerca de duas vezes maior do que as células selvagens ( $P < 0,01$ ). A frequência de células mutantes em apoptose inicial diminuiu significativamente após a reposição de soro no meio de cultura por mais 48 horas ( $P < 0,001$ ), atingindo proporções semelhantes às células selvagens (Figura 16). Por sua vez, nós não observamos diferenças significativas nas proporções de células vivas anexina-V<sup>-</sup>PI<sup>-</sup> ou de células necróticas anexina-V<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> entre as células Jurkat selvagens e mutantes (Figura 16). Além disso, nós também avaliamos a frequência de caspase-3 clivada em células mantidas na ausência de soro fetal bovino por até 48 horas. De forma preliminar, os nossos achados não corroboraram as observações realizadas nos ensaios de exclusão de PI e anexina-V, uma vez que nós não observamos uma diferença da população caspase-3 clivada<sup>+</sup> de células mutantes para *ITGA4* em relação ao controle (Figura 17).



**Figura 16. A perda da integrina  $\alpha 4$  torna as células mais suscetíveis à apoptose quando submetidas a condições de estresse por privação de soro.** Análise por citometria de fluxo de células Jurkat selvagem (WT) em ciano e Jurkat deficientes para *ITGA4* (KO) em vermelho submetidas a estresse por privação de soro fetal bovino. Frequências de células vivas (esquerda), células em apoptose inicial (centro) e células necróticas (direita). Acima, os gráficos dot plot exibem experimento representativo de células cultivadas sem soro fetal bovino por 48 horas (0 h) e após adição de soro (48 h). As linhas centrais mostram as médias de 7 experimentos independentes. As barras de erro representam SEM (do inglês, standard error of mean) \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$  (teste de comparações múltiplas de Sidak).

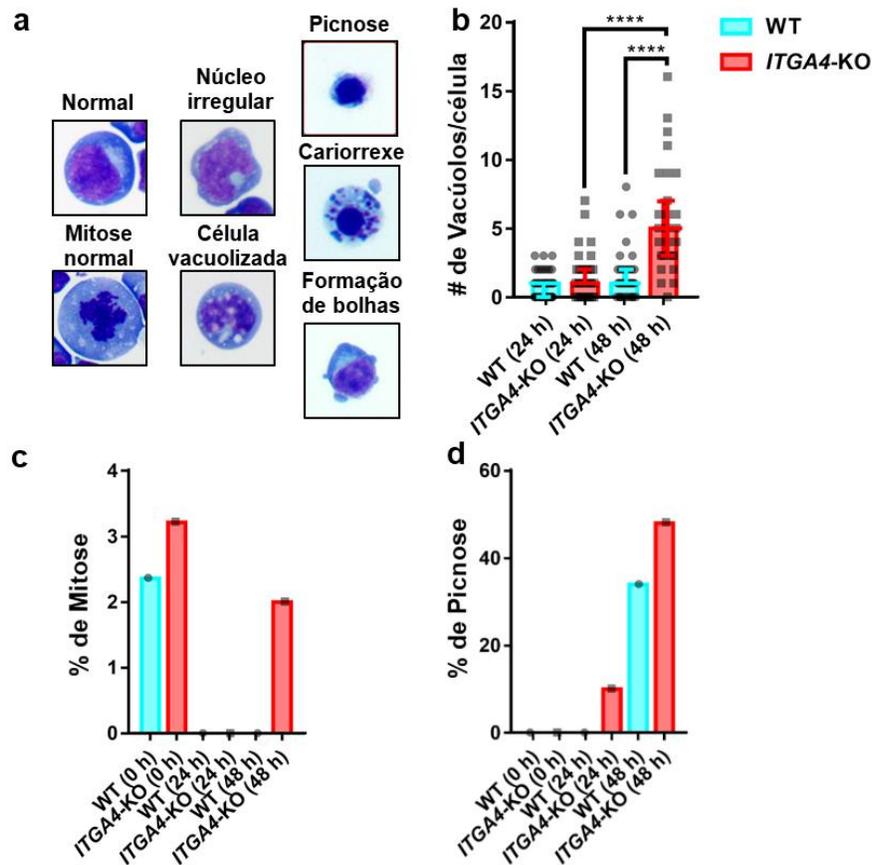


**Figura 17.** As células mutantes para *ITGA4* exibiram maior ativação de caspase-3 quando submetidas a condições de estresse por privação de soro. Análise por citometria de fluxo de células Jurkat selvagem (WT, ciano) e *ITGA4-KO* (vermelho) submetidas a estresse por privação de soro fetal bovino por até 48 h, conforme indicado. À esquerda, os gráficos dot plot exibem experimento representativo de células cultivadas sem soro fetal bovino por 48 h. À direita, frequências de ativação de caspase-3 na presença ou ausência de soro fetal bovino por até 48 h, conforme indicado. As linhas centrais mostram as medianas de 8 experimentos independentes, que estão representados como pontos de dados (preto). As barras de erro representam os intervalos de confiança de 95%. \*\*\*\*,  $P < 0.0001$  (teste de comparações múltiplas de Tukey).

### 3. Morfologia celular

Uma vez que a contribuição da apoptose na morte de células controle e *ITGA4-KO* parece ser apenas moderada (aproximadamente 5–10%) em condições de privação de soro por até 48 h (Figura 16), nós decidimos investigar outros tipos de morte celular. Para tal, realizamos análises morfométricas das células mantidas nessa condição e coradas pelo método de Panótico rápido. Nenhuma das duas linhagens apresentou picnose quando mantidas em meio suplementado com soro (0 h) (Figura 18B). Entretanto, a privação de soro fetal bovino por até 48 horas (48 h) aumentou a frequência de picnose para 30-50% nos dois grupos, indicando que esse tratamento também induz apoptose. A divisão celular foi vista em ambas as células no período de 0 h, apenas um evento de divisão foi detectado às 48 h na *ITGA4-KO*. O reduzido número de células analisado nesse ponto impediu que pudéssemos tirar conclusões sobre o efeito da privação de soro na proliferação de células WT e *ITGA4-KO*. Experimentos adicionais serão realizados para avaliar o impacto da deleção de *ITGA4* na proliferação celular em condições de estresse por privação de nutrientes, uma vez que as integrinas são conhecidas por influenciarem o maquinário mitótico (144).

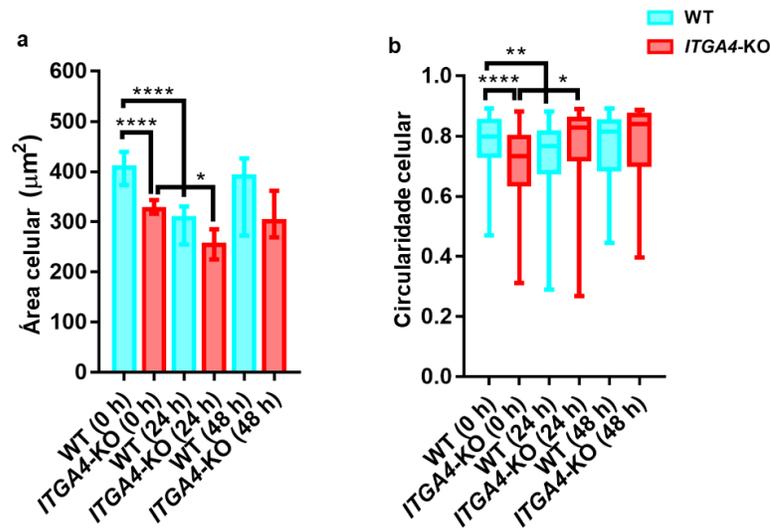
Por sua vez, a morte celular por autofagia é caracterizada morfologicamente pela acumulação de vacúolos proeminentes (145). As células mutantes para *ITGA4* apresentaram um maior número vacúolos proeminentes por célula do que as células selvagens mantidas sob condições de privação de soro (Figura 18B). Além disso, observamos formação de projeções citoplasmáticas em forma de bolhas (*blebbing*), que são sugestivas de apoptose, apenas nas células *ITGA4*-KO no tempo de 24 h (Figura 18A).



**Figura 18. A privação de nutrientes induz diferentes padrões morfológicos, especialmente na célula *ITGA4*-KO.** (a) Exemplos das categorias morfológicas observadas. (b, c, d) Análise morfométrica a partir de cytospin de células Jurkat WT (ciano) e *ITGA4*-KO (vermelho) submetidas a estresse por privação de soro fetal bovino, conforme indicado, e coradas pelo método de panótico rápido. (b) Número de vacúolos por célula. WT (24 h) N=54; *ITGA4*-KO (24 h) N=30; WT (48 h) N=36; *ITGA4*-KO (48 h) N=26. (c) Frequência de mitose. WT (0 h) N=170; *ITGA4*-KO (0 h) N= 218; WT (24 h) N=54; *ITGA4*-KO (24 h) N=28; WT (48 h) N=38; *ITGA4*-KO(48 h) N=26. (d) Frequência de picnose. WT (0 h) N=170; *ITGA4*-KO (0 h) N= 218; WT (24 h) N=54; *ITGA4*-KO (24 h) N=28; WT (48 h) N=38; *ITGA4*-KO (48 h) N=26.

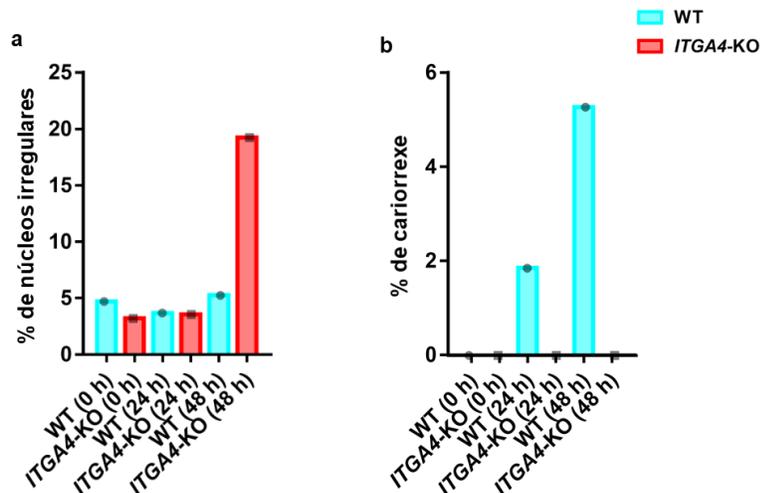
Após 24 h sob privação de nutrientes, as duas linhagens apresentaram uma diminuição da área celular (Figura 19A) e as células *ITGA4*-KO apresentaram um aumento na sua circularidade (Figura

19B). Nessa análise, o valor de circularidade igual a 1 indica um círculo perfeito, enquanto valores próximos à 0 indicam formas alongadas (146).



**Figure 19. Área celular e circularidade em células Jurkat WT e *ITGA4*-KO submetidas à privação de soro.** Análise morfométrica a partir de *cytospin* de células Jurkat WT (ciano) e *ITGA4*-KO (vermelho) submetidas a estresse por privação de soro fetal bovino, conforme indicado, e coradas pelo método de Panótico rápido. (a) Área celular e (b) circularidade celular. WT(0 h) N=170; *ITGA4*-KO (0 h) N= 218; WT (24 h) N=54; *ITGA4*-KO (24 h) N=28; WT (48 h) N=38; *ITGA4*-KO (48 h) N=26.

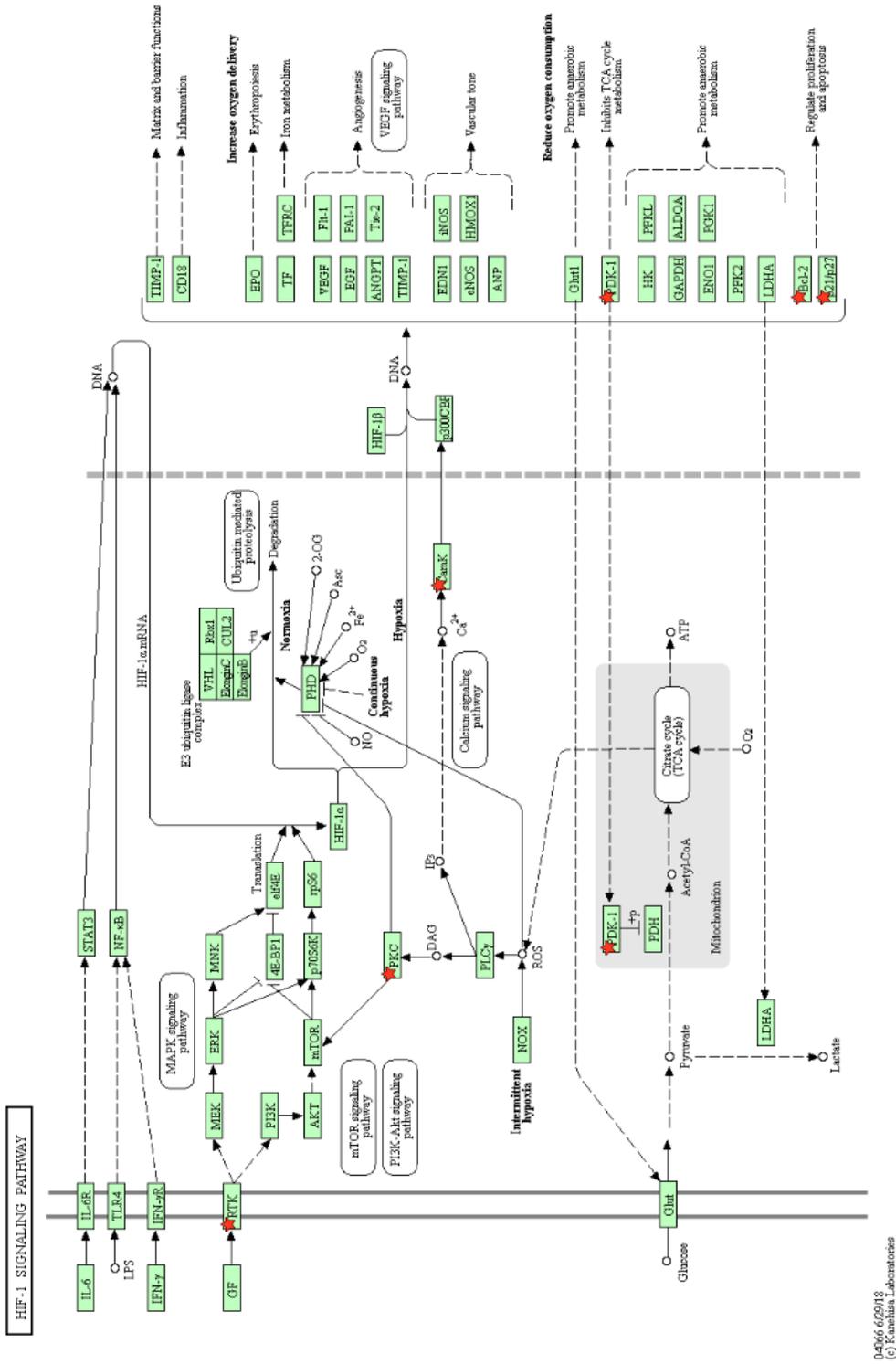
Além disso, a frequência de núcleos irregulares na célula *ITGA4*-KO foi maior no tempo de 48 h (Figura 20A). Nós observamos cariorrexe apenas em células WT privadas de soro (Figura 20B).



**Figure 20. Frequência de núcleos irregulares e cariorrexe em células Jurkat WT e *ITGA4*-KO submetidas à privação de soro.** Análise morfométrica a partir de *cytospin* de células Jurkat WT (ciano) e *ITGA4*-KO (vermelho) submetidas a estresse por privação de soro fetal bovino, conforme indicado, e coradas pelo método de panótico rápido. (a) frequência de núcleos irregulares e (b) frequência de cariorrexe. WT(0 h) N=170; *ITGA4*-KO (0 h) N= 218; WT(24 h) N=54; *ITGA4*-KO(24 h) N=28; WT(48 h) N=38; *ITGA4*-KO(48 h) N=26.

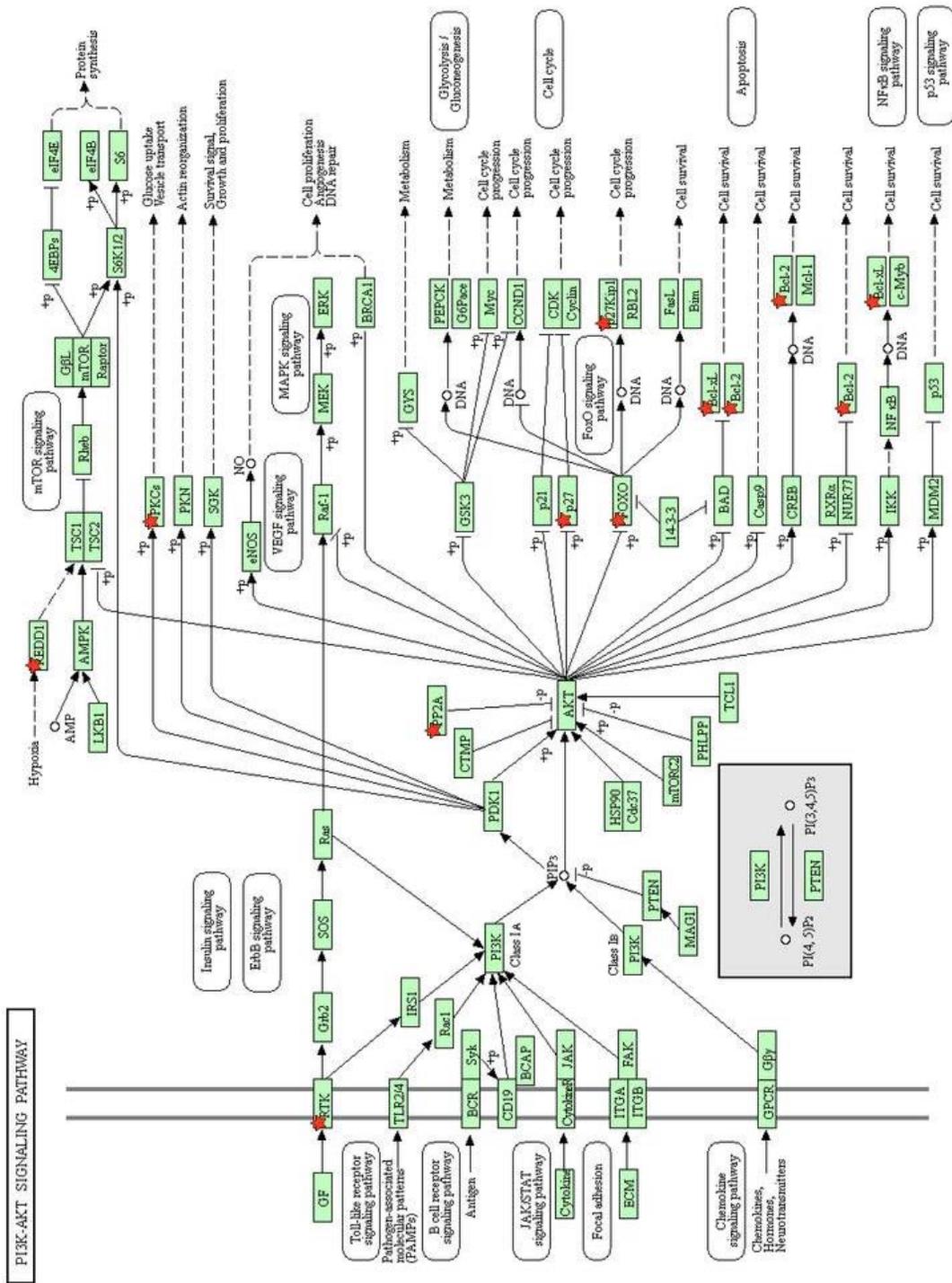
#### **4. A inativação da integrina $\alpha 4$ ocasiona uma diferença na regulação de vias associadas à autofagia**

Considerando, portanto, a possibilidade de autofagia nas células nocautes a partir das análises morfométricas, nós decidimos avaliar a expressão de genes relacionados à autofagia nas células mantidas em condições normais de cultivo (com soro). A partir da utilização do Autophagy Database, que possui 1183 genes humanos relacionados à autofagia (147), nós buscamos genes diferencialmente expressos (DE) nas duas linhagens de Jurkat (WT e *ITGA4*-KO). A nossa análise identificou 121 genes DE nas células WT e *ITGA4*-KO, com genes enriquecidos nas vias de HIF-1, PI3K-AKT e NF $\kappa$ B, respectivamente (Figuras 21, 22 e 23). Ao comparar os genes com expressão alterada entre as duas linhagens, nós encontramos quatro genes alterados comuns a essas vias, *PRKCA*, *IGF1R* e *BCL2*. O gene *BCL2* está presente em todas as três vias (Figuras 21, 22 e 23).



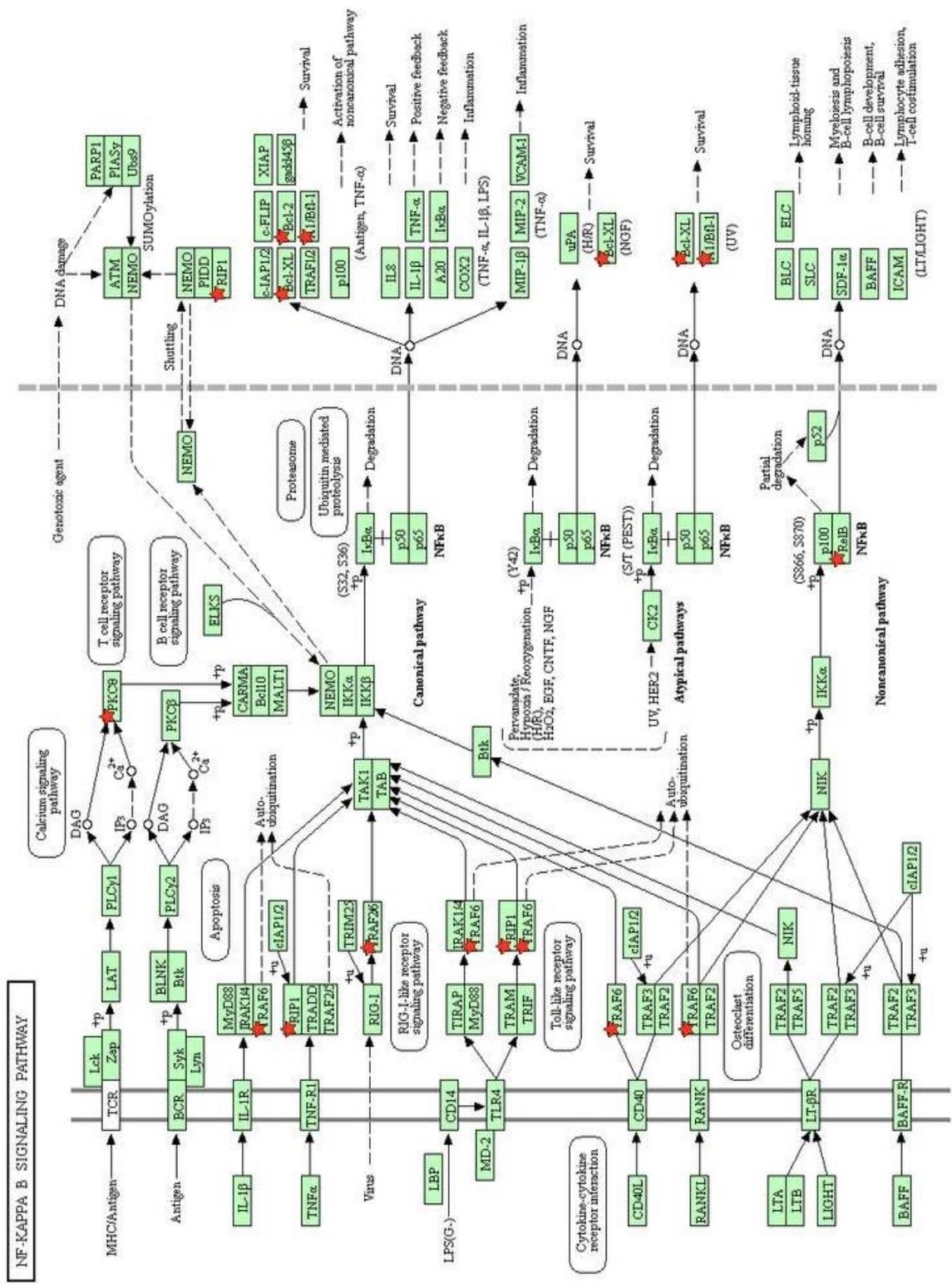
04/06/2008  
 (c) Kazuhisa Takamizawa

**Figure 21. Via de HIF-1.** Representação esquemática dos genes pertencentes à via HIF-1 e suas interações. Os genes identificados com uma estrela vermelha apresentaram-se diferencialmente expressos ( $\log_2 \text{fold change} > 1$ ) entre as linhagens selvagem e *ITGA4*-KO após análise por RNA-seq.



04151\_6251/8  
(c) Kamitani Laboratorise

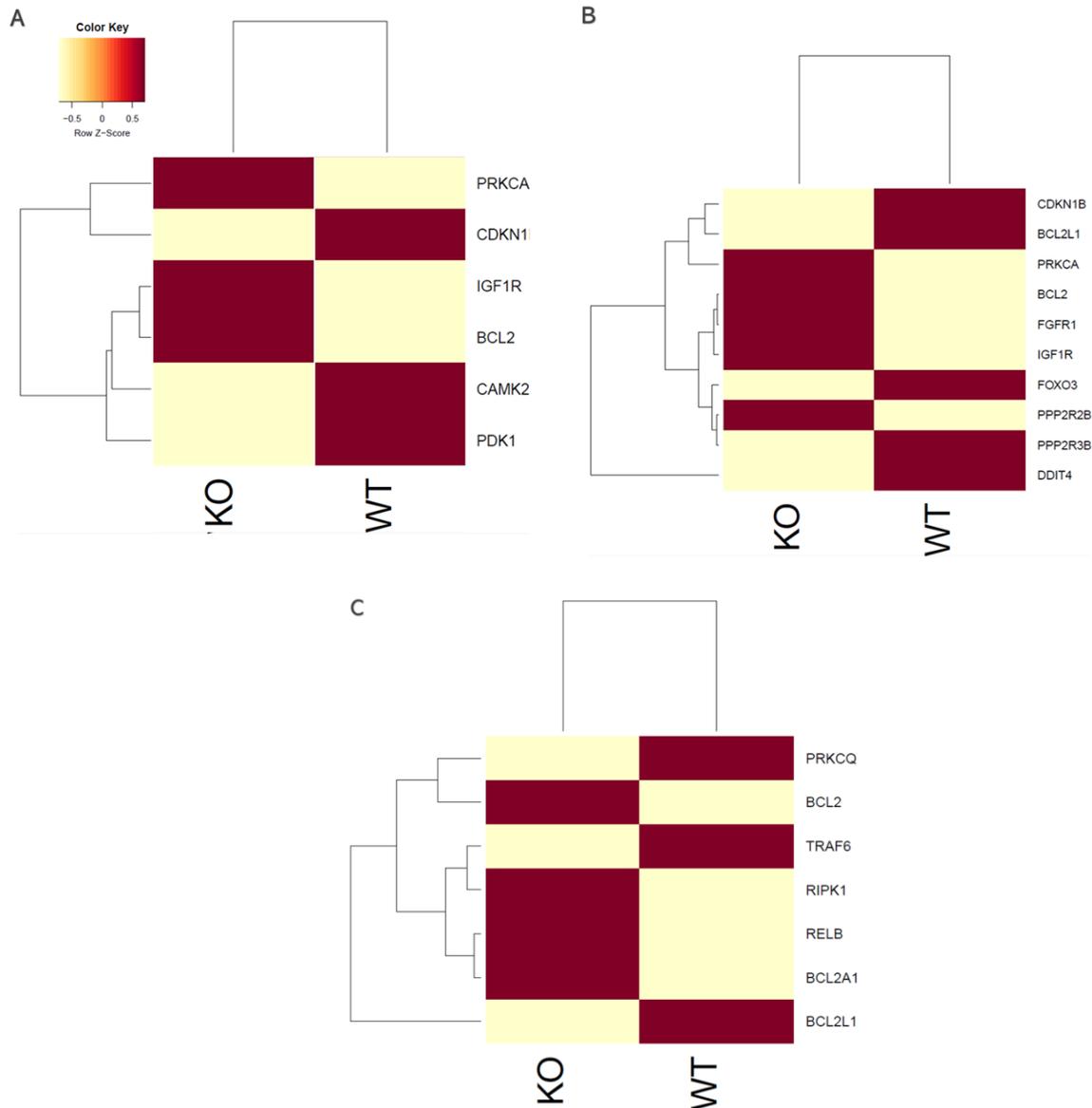
**Figure 22. Via de PI3K-AKT.** Representação esquemática dos genes pertencentes à via de PI3K-AKT e suas interações. Os genes identificados com uma estrela vermelha apresentaram-se diferencialmente expressos ( $\log_2 \text{fold change} > 1$ ) entre as linhagens selvagem e ITGA4-KO após análise por RNA-seq.



04/064.10/28/16  
 (c) Kaushika Laboratórios

**Figura 23. Via de NFκB.** Representação esquemática dos genes pertencentes à via de NFκB e suas interações. Os genes identificados com uma estrela vermelha apresentaram-se diferencialmente expressos ( $\log_2 \text{fold change} > 1$ ) entre as linhagens selvagem e *ITGA4-KO* após análise por RNA-seq.

Dentre os seis genes diferencialmente expressos na via de HIF-1, três tiveram sua expressão aumentada na linhagem *ITGA4*-KO: *PRKCA*, *TGF1R* e *BCL2* (Figura 24A). Na via de PI3K-AKT, os genes *PRKCA*, *BCL2*, *FGFR1*, *IGF1R* e *PPP2R2B* apresentaram maior aumento dos níveis de expressão nas células *ITGA4*-KO (Figura 24B). Já a via de NFκB apresentou sete genes diferencialmente expressos nas duas linhagens. Entre eles, os genes *BCL2*, *RIPK1*, *RELB* e *BCL2A1* tiveram sua expressão aumentada apenas nas células *ITGA4*-KO (Figura 24C).



**Figura 24. Perfil de perfil transcricional das linhagens Jurkat WT e *ITGA4*-KO.** *Heatmap* representando os genes diferencialmente expressos nas vias de HIF-1 (A), PI3K-AKT (B) e NF κB (C).

## 5. Identificação de Polimorfismo de Nucleotídeo Único em *ITGA4*

São descritos 21.506 SNPs no gene *ITGA4* de *Homo sapiens*, de acordo com o banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). Utilizando o programa PolyPhen-2, nós encontramos dois SNPs não-sinônimos, rs35322532 e rs13029893, com valores de 0.906 e 1.0, respectivamente. Esses valores indicam que as substituições são possivelmente deletérias (Tabela 1). Esses dois polimorfismos potencialmente relevantes correspondem às variantes de  $\alpha 4$  R1007S e S634T, respectivamente.

**Tabela 1.** SNPs não-sinônimos selecionados para a cadeia  $\alpha 4$  de VLA-4, utilizando SNPs3D.

| <i>ITGA4</i> |             |         |                      |
|--------------|-------------|---------|----------------------|
| SNP ID       | Modificação | Posição | Resultado PolyPhen-2 |
| rs35419274   | V → I       | 359     | 0.002                |
| rs35322532   | S → T       | 634     | 0.906                |
| rs1143675    | V → A       | 824     | 0.004                |
| rs1143676    | R → Q       | 878     | 0.063                |
| rs13029893   | R → S       | 1007    | 1.00                 |

É importante ressaltar que o SNP rs13029893 está localizado em um motivo proteico altamente conservado entre as integrinas (Figura 3). Essa sequência de aminoácidos presente nas caudas citoplasmáticas das subunidades  $\alpha$  de integrinas, mais especificamente o seu resíduo de arginina, é responsável pela interação com o aspartato da subunidade  $\beta$  e a consequente formação da ponte salina, que está relacionada à conformação menos ativa da integrina (4).

## 6. Predição dos efeitos de polimorfismos de base única em *ITGA4*

As análises dos efeitos dos polimorfismos de base única foram feitas utilizando o servidor Haddock, com avaliação da interação dos ligantes paxilina, fibronectina e VCAM-1 à subunidade  $\alpha 4$  da integrina e às suas variantes R1007S e S634T.

### 6.1. Ligantes

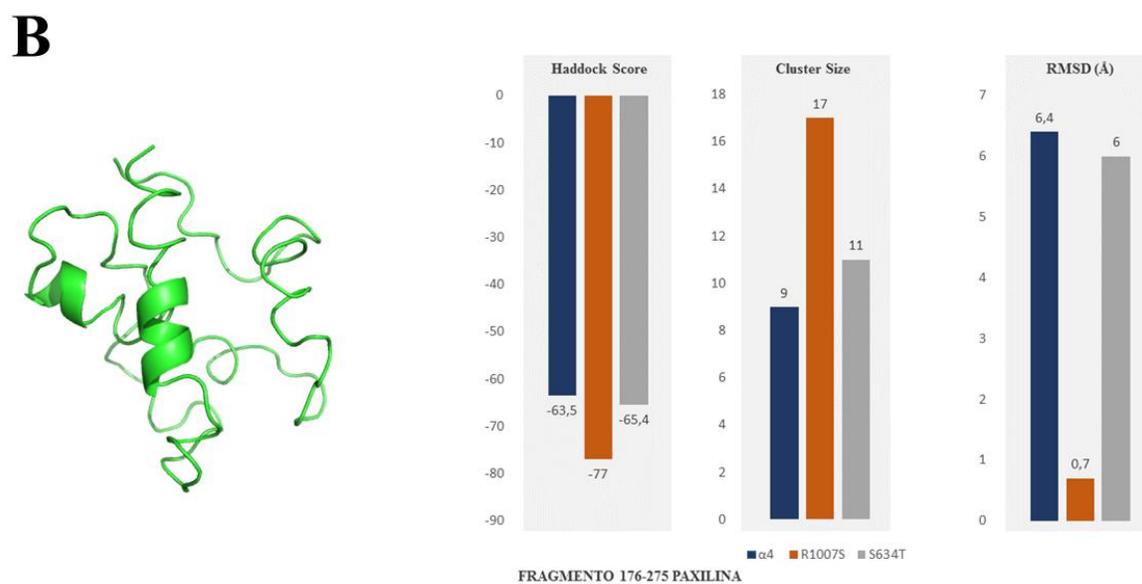
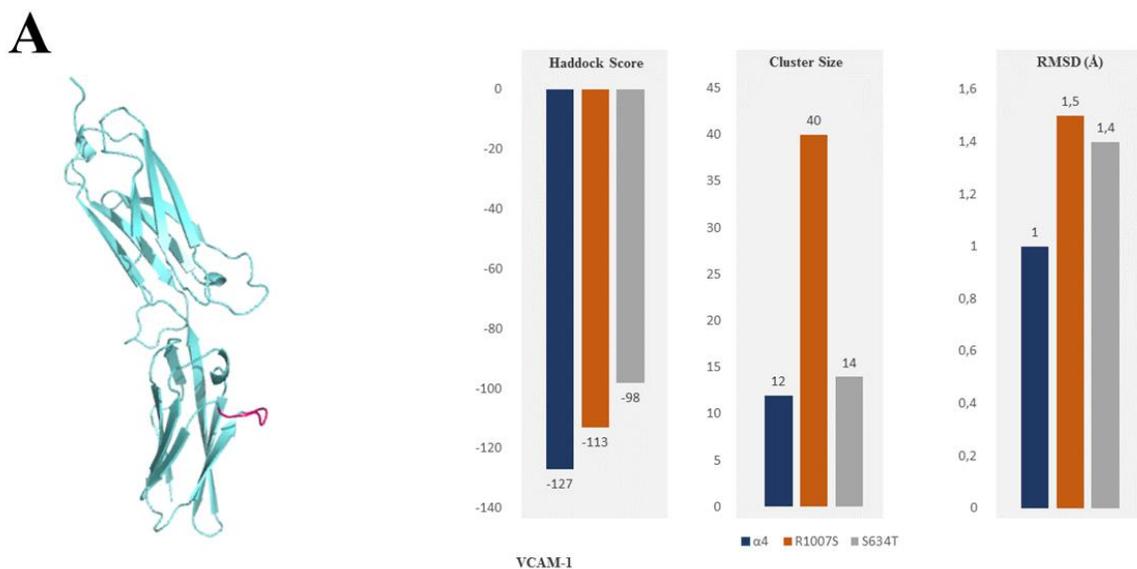
#### 6.1.1. Fibronectina

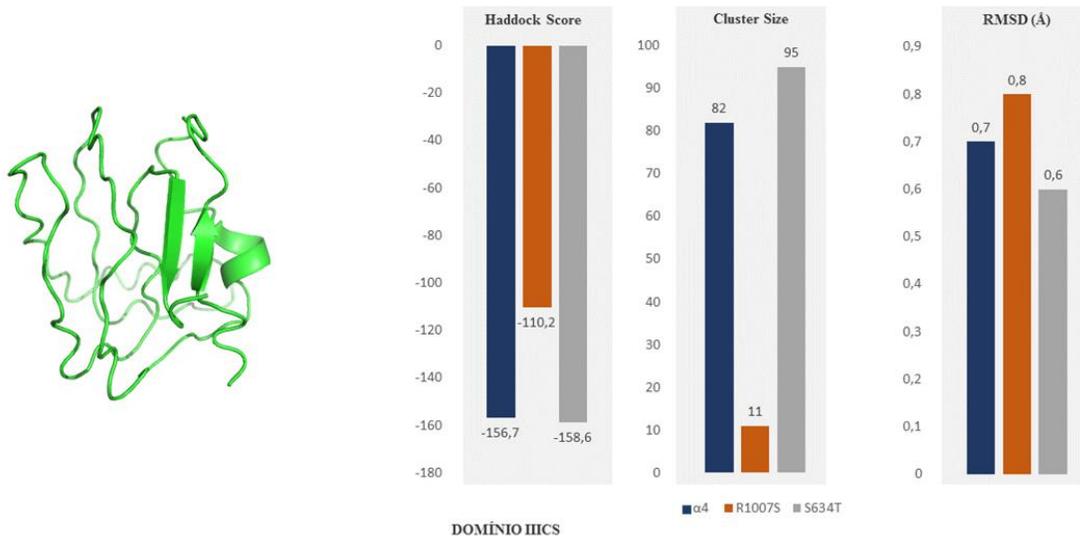
O segmento IIICS foi modelado pela técnica *ab initio* utilizando o servidor I-TASSER, pois não obtivemos resultados de similaridade no alinhamento utilizando o Protein BLAST. A estrutura secundária da sequência foi avaliada utilizando os servidores Jpred4 e PSIPRED. JPred4 é um servidor





indicando que a alteração parece favorecer a interação entre essas duas proteínas (Figura 28B). Para o segmento IIICS da fibronectina, os melhores parâmetros foram observados com a variante S634T, o que indica um possível aumento na afinidade entre essas duas moléculas (Figura 28C).



**C**

**Figura 28. Docking molecular para as subunidades  $\alpha 4$  selvagem e as variantes R1007S e S634T.** Representações gráficas dos valores de Haddock Score, Cluster Size e RMSD para as diferentes subunidades, conforme indicado. (A) Encaixe com VCAM-1. (B) Encaixe com Paxilina. (C) Encaixe com o domínio IIIICS.

## DISCUSSÃO

A integrina VLA-4 se distribui em diversas células do sistema imune, inato e adaptativo, e também em outros tipos celulares, como células epiteliais e musculares. Os estudos sobre sua função demonstram um papel preponderante nos processos de ativação e transmigração em contexto inflamatório, particularmente das células T (3). Além de ter sua importância em processos de sobrevivência, como a *anoikis* (58). Nesse contexto, o presente trabalho ressalta que, entre os diversos dados gerados pelas análises de RNA-Seq das linhagens Jurkat selvagem e deficiente em *ITGA4*, pode ser identificado um número significativo de genes diferencialmente expressos associados à morte celular em condições normais de cultivo.

A indução da maquinaria molecular de resposta ao estresse por privação de soro é uma maneira direta de avaliarmos como a subunidade  $\alpha 4$  da integrina pode controlar processos associados à sobrevivência e à morte celular programada. Por exemplo, a autofagia também pode ser induzida pela diminuição do nível de fator de crescimento, principal componente do soro fetal bovino. O mTORC1, um dos complexos da via de mTOR é regulado pelas vias de insulina/IGF-1 (do inglês, *insulin growth factor-1*) e PI3K-AKT. Esse complexo também é responsável por controlar negativamente a indução de autofagia (151).

Por essas razões, a avaliação da função da subunidade  $\alpha 4$  de integrinas em células T linfoblásticas e a caracterização da sua relação com a consequente ativação de mecanismos antes não relacionados, nos leva a postular que alterações nesta proteína podem implicar em prejuízos na função celular, particularmente, a sustentação da sobrevivência celular.

De acordo com os nossos resultados provenientes do ensaio de Anexina V x PI, as células mutantes para a subunidade  $\alpha 4$  pareceram ser mais sensíveis à ausência de soro fetal bovino no meio e, portanto, mais suscetíveis à morte por apoptose. Entretanto, nós observamos possíveis características morfológicas de células em processo autofágico na linhagem *ITGA4-KO*. Além disso, já foi visto em células aderentes que integrinas  $\beta 1$  e  $\beta 3$  não ligadas com suas subunidades  $\alpha$  são capazes de promover a apoptose pelo recrutamento da caspase-8 à membrana plasmática de maneira independente de receptores de morte ou da molécula adaptadora, FADD (99).

A apoptose pode ocorrer por duas vias principais, a intrínseca e a extrínseca. As duas cascatas convergem para a clivagem da caspase-3 que resulta em fragmentação do DNA, degradação de proteínas nucleares e do citoesqueleto, formação de corpos apoptóticos. A via extrínseca é iniciada pelas interações TNF/TNFR1 e FasL/Fas. Após essa ligação, proteínas adaptadoras, FADD e TRADD, são recrutadas para a membrana plasmática, assim como RIP (96). RIP é uma proteína capaz de ligar-se

ao domínio intracelular de TNFR1 e de Fas. A hiperexpressão de RIP causa mudanças morfológicas características de apoptose, sendo caracterizada assim como proteína indutora de apoptose (152). É interessante notar que nós observamos uma maior expressão dos genes *TNFRSF1A* e de *RIPK1* em células deficientes em *ITGA4*. Na linhagem deficiente para o gene *ITGA4* nós observamos o aumento de expressão de genes pró-apoptóticos, como *CASP9*, *BIK* e *PMAIP1* e o gene antiapoptótico *BCL2*. Entretanto o gene antiapoptótico *BCL2L1* se apresentou menos expresso nessa linhagem.

Normalmente a ativação da caspase-3 é associada como um marcador clássico de apoptose, assim como a exposição da fosfatidilserina. Nós vimos nos resultados de RNA-Seq que a caspase-3 efetora está menos expressa nas células deficientes em *ITGA4*. Porém, ao observarmos o resultado da ativação da caspase feito por citometria, as linhagens não apresentaram diferenças na frequência de caspase-3 clivada. Além disso, outros estudos já verificaram a ativação da caspase-3 não relacionada com apoptose, como na proliferação de células T *in vitro* (153) e na diferenciação de células-tronco hematopoiéticas (154). A expressão da caspase-9, responsável pela ativação da caspase-3, está maior na linhagem celular deficiente em *ITGA4* e o nível de expressão da caspase-4 inflamatória também se mostrou superior nessa linhagem. É importante ressaltar que a ativação de caspase-4 tem sido relacionada à apoptose induzida por estresse do retículo endoplasmático em células neuronais, podendo estar envolvida na patogênese da doença de Alzheimer (155).

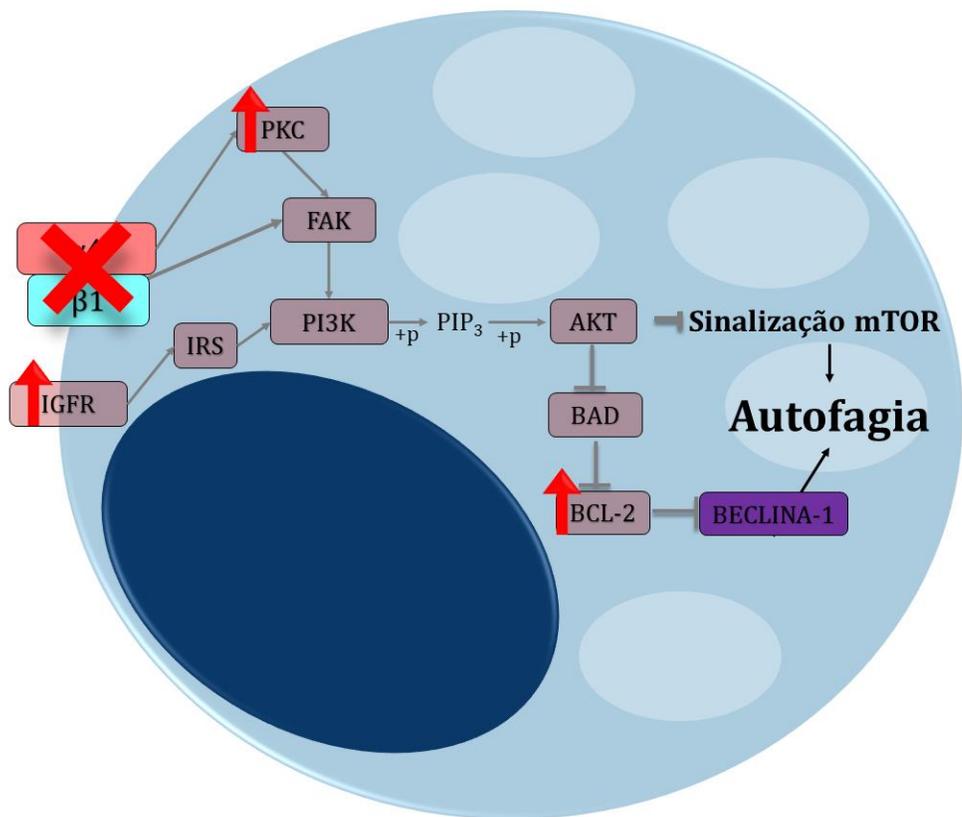
Nesse sentido, a observação das características morfológicas de células é uma abordagem relevante para compreender o processo de morte celular em questão. As análises morfológicas permitiram o reconhecimento de algumas características distintas entre as duas linhagens, como a presença de vacúolos. A morte por apoptose difere em alguns aspectos da morte derivada de um processo autofágico, como a degradação de componentes citoplasmáticos, causando uma perda da eletrodensidade no citoplasma, que precede o colapso nuclear, caracterizado pela picnose (156). A presença de morte autofágica aparenta ocorrer em condições fisiológicas específicas e resposta a mudanças no ambiente em que a célula se encontra (156). Nós observamos picnose nas duas linhagens, entretanto, a cariorrexe só foi observada em células selvagens. Foi visto em neurônios corticais, cultura primária, a ativação de caspase-3 e picnose associada com autofagia independente da proteína Beclina-1. Desse modo, o processo picnótico pode ocorrer em células autofágicas (157).

A apoptose e a autofagia são processos evolutivamente conservados e estão envolvidos na homeostase do tecido. Defeitos em um desses processos pode resultar no desenvolvimento de patologias, como o câncer e doenças neurodegenerativas. As vias de sinalização desses dois processos possuem convergências, assim podendo regular-se a fim de garantir a manutenção da homeostase em resposta à um sinal de estresse, como a ausência de nutrientes (158).

As células apoptóticas inicialmente se tornam redondas e se retraem, assim se distanciando das células próximas. Posteriormente, a célula passa por modificações na membrana plasmática que formam prolongamentos culminando em bolhas. Essas vesículas formadas são também chamadas de corpos apoptóticos (159). Nós observamos uma diminuição de tamanho celular em ambas linhagens. Nas células *ITGA4*-KO essa diminuição foi mais expressiva, assim como o arredondamento. Nós também detectamos eventos de *blebbing* apenas nessa linhagem, especificamente, após 24 h sem soro fetal bovino. Entretanto, devemos considerar possíveis alterações morfológicas devido à utilização da citocentrífuga, o que pode ter gerado artefatos.

A interação de TNFR1 com o seu ligante TNF resulta no recrutamento de moléculas de sinalização que formam um complexo multiproteico conhecido como complexo I. Esse complexo é composto por TRADD, RIP1, TRAF2 e cIAP1/2 e tem como consequências a ativação de NF- $\kappa$ B, JNK e p38 (158). Nós observamos um aumento na expressão TNFR1 em células *ITGA4*-KO, assim como possível alteração na via de NF- $\kappa$ B. Pelos nossos dados de RNA-Seq, outra via possivelmente alterada, seria a via PI3K-AKT. Essa via está a montante de mTOR, que é o principal regulador do processo autofágico por inibir a formação do autofagossoma, e é regulado pela supressão de nutrientes (160). A via PI3K-AKT é capaz de promover sobrevivência celular ao inibir a translocação da proteína pró-apoptóticas, Bax, do citoplasma para a mitocôndria, com posterior liberação de citocromo c e início da via apoptótica intrínseca (161). Além disso, PI3K-AKT é também uma via a jusante da proteína VLA-4. Assim, a ausência dessa molécula transdutora de sinal pode levar à não ativação da via, podendo levar tanto à apoptose, como à autofagia.

A proteína Bcl-2, antiapoptótica, também possui atividade reguladora de autofagia ao inibir a proteína Beclina-1 que participa na formação do autofagossoma (162). O gene da proteína Bcl-2 se encontra mais expresso na célula nocaute; entretanto, essa célula apresenta níveis de apoptose maiores e possível ocorrência de autofagia quando comparada à célula selvagem. A inativação de um gene pode levar a uma alteração da expressão de outras proteínas que são capazes de modular o mecanismo afetado, com possibilidade de a sinalização/resposta afetada ser recuperada completa ou parcialmente (163). Desse modo, a suposição de que a não expressão da subunidade  $\alpha$ 4 pode estar estimulando a expressão de genes antiapoptóticos parece plausível, já que essa proteína pode ativar vias de sobrevivência celular.



**Figura 29. Vias relacionadas a *ITGA4* e autofagia em células que não expressam a subunidade  $\alpha 4$  de integrinas.** Os genes das proteínas PKC, IGFR e BCL-2 tiveram seu nível de expressão aumentado nas células que não possuíam *ITGA4* (setas em vermelho).

Com o objetivo de avaliar a relevância das interações estruturais da subunidade  $\alpha 4$  de integrina, através de abordagens *in silico*, nós decidimos analisar variantes de nucleotídeo único em substituição à sequência referência. A subunidade  $\alpha 4$ , com a alteração no motivo altamente conservado GFFKR, apresentou valores de Haddock Score, Cluster Size e RMSD que indicam que essa proteína parece ter uma melhor interação com a paxilina. Apesar de o SNP rs13029893 não ter seus dados de frequência populacional bem estabelecidos no banco de dados dbSNP, os dados obtidos por *docking* indicam que essa região citoplasmática, alvo da variante R1007S, é de grande importância para a ligação à paxilina. Para o domínio IIICS da fibronectina, os melhores parâmetros foram observados utilizando a variante S634T, o que indica uma melhor interação entre essas duas moléculas. Além disso, devem ser feitos

ensaios *in silico*, como a dinâmica molecular, visando o estudo da manutenção da estabilidade da estrutura dessa proteína. Da mesma forma, são também necessários estudos de possíveis sítios alostéricos para averiguarmos a possibilidade de uma mutação intracelular aumentar a afinidade a um ligante na porção extracelular da proteína. De forma mais relevante, se faz necessária a avaliação *in vitro* das variantes R1007S e S634T da subunidade  $\alpha 4$  para confirmarmos a suposição de que essas variantes possuem maior afinidade aos ligantes naturais, proposta pela análise *in silico*. Além disso, os ensaios *in vitro* com essas variantes permitirão inferir o papel das interações entre integrinas  $\alpha 4$  com a paxilina, a fibronectina e o VCAM-1, que podem influenciar em processos celulares essenciais, como a apoptose e autofagia. De fato, a geração dos plasmídeos para clonagem das referidas mutações já está em andamento em nosso laboratório.

A ligação de paxilina à porção citoplasmática da subunidade  $\alpha 4$  leva a uma maior migração celular e a inibição dessa interação pode bloquear seletivamente respostas celulares dependentes de  $\alpha 4$  (118). Além disso, a arginina presente no motivo GFFKR em subunidade  $\alpha 4$  é responsável por formar uma ponte salina com um aspartato presente na subunidade  $\beta 1$ , que é responsável por regular o nível de ativação da integrina (16). Assim, a interrupção dessa regulação pode levar a uma alteração no ciclo de adesão e deadesão necessário para a migração celular. Portanto, são necessários estudos sobre possíveis alterações na transmigração celular de linfócitos T contendo a variante R1007S.

A integrina VLA-4 é essencial em vários processos biológicos importantes por ser responsável pela transdução bidirecional de sinais externos e internos à célula. A obtenção de uma linhagem deficiente para a subunidade  $\alpha 4$  da integrina nos forneceu uma ferramenta relevante para observarmos os fenômenos relacionados diretamente à sua função em linfócitos T. Por sua vez, a produção de células que possuam alterações pontuais nessa proteína, como no caso das variantes relacionadas a SNPs considerados relevantes, pode revelar mais especificamente quais regiões de *ITGA4* são essenciais para a sua função e os seus efeitos no linfócito T.

## CONCLUSÃO

Na biologia das células T, a integrina VLA-4 possui relevante papel em diversos processos celulares, entre eles a ativação e a migração transendotelial. A integrina estudada é envolvida em diversas doenças humanas, como diversos tipos de câncer, doenças autoinflamatórias e esclerose múltipla. Desse modo, modelos de estudo *in vitro* para avaliar o papel dessa integrina, especificamente, a subunidade  $\alpha 4$ , poderão elucidar possíveis mecanismos relacionados à utilização de biofármacos antagonistas ao VLA-4 já comercializados, e também às possíveis respostas celulares que devem ser consideradas ao utilizar essa proteína como alvo terapêutico.

No presente trabalho, nossos resultados sugerem um papel regulador da integrina  $\alpha 4$  sobre os mecanismos de sobrevivência de células T, com possível associação dessa proteína a diversas vias reguladoras dos eventos de morte celular. A partir da avaliação do impacto da inativação gênica da subunidade  $\alpha 4$  da integrina em células Jurkat associada ao estresse por privação de soro, concluímos de maneira preliminar, que ocorre uma mudança em vias intracelulares que culminam na morte celular nessa linhagem. Adicionalmente, ao avaliarmos, *in silico*, a interação de variantes da subunidade  $\alpha 4$ , contendo SNPs de interesse, com seus ligantes naturais por meio de *docking*, conseguimos observar o que parece ser um aumento de afinidade na interação dos ligantes à sua região específica, intracelular ou extracelular, no receptor. Portanto, os SNPs selecionados parecem revelar regiões dessa subunidade que podem afetar sua atividade, indicando uma mudança no seu estágio de ativação e, conseqüentemente, apontando para possíveis alterações funcionais do linfócito T. Por fim, o emprego das linhagens portando as variantes selecionadas poderá trazer avanços na avaliação do impacto funcional das mesmas e sua posterior aplicação em medicina personalizada.

## PERSPECTIVAS

Com esse estudo, esperamos contribuir para uma melhor compreensão do papel da integrina  $\alpha 4$  e suas variantes nas funções de células T, especialmente em processos celulares distintos dos eventos já melhor caracterizados adesão e migração celulares, como no caso da sobrevivência celular. Além disso, esperamos caracterizar as funções relacionadas aos SNPs identificados no desenvolvimento de doenças inflamatórias. Desse modo, é de nosso interesse observar e comparar os dados de morte celular entre as linhagens que contenham as variantes R1007S e S634T, e as linhagens já presentes no Laboratório (selvagem e deficiente em *ITGA4*). Visamos, assim, obter informações sobre a natureza na biologia da célula T, observando como a região da proteína pode influenciar em processos biológicos específicos como a apoptose e autofagia. Essa informação será possível ser obtida, pois as variantes S634T e R1007S que abordaremos nos próximos experimentos, se apresentam, respectivamente, nas porções intracelular e extracelular.

Com os resultados provenientes do RNA-Seq juntamente com os experimentos de citometria e análise morfológica das células *ITGA4*-KO foi possível relacionar a alteração da via de PI3K-AKT com os eventos observados de sobrevivência celular e apoptose dessas células. Assim, estudos mais aprofundados para confirmar essa hipótese serão conduzidos posteriormente, de modo a elucidar todos os componentes envolvidos nessa susceptibilidade à morte e à autofagia. Nesse sentido, já estão planejadas análises das redes de interação proteína-proteína entre os genes que tiveram sua expressão mais alterada, assim como ensaios para detecção dos níveis proteicos das principais proteínas relacionadas. Com esses ensaios, esperamos elucidar potenciais mecanismos reguladores do processo autofágico mediados pela ativação da subunidade  $\alpha 4$  em linfócitos T.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Humphries MJ. Integrin Structure. *Biochem Soc Trans.* 2000;
2. Hynes RO. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992.
3. Hynes RO. Integrins : Bidirectional , Allosteric Signaling Machines In their roles as major adhesion receptors. *Cell.* 2002;110(6):673–87.
4. Abram CL, Lowell CA. The Ins and Outs of Leukocyte Integrin Signaling. *Annu Rev Immunol.* 2009;
5. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2006;
6. Administration F and D. Tysabri (natalizumab) - FDA. 2008;1–30.
7. Mooney S. Bioinformatics approaches and resources for single nucleotide polymorphism functional analysis. *Briefings in Bioinformatics.* 2005.
8. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single- nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* (80- ). 1998;
9. Ďurmanová V, Shawkatová I, Javor J, Párnická Z, Čopíková-Cundráková D, Turčáni P, et al. VLA4 Gene Polymorphism and Susceptibility to Multiple Sclerosis in Slovaks. *Folia Biol (Praha).* 2015;
10. Smigielski EM. dbSNP: a database of single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 2000;
11. Springer TA. Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin  $\alpha$ -subunits into a  $\beta$ -propeller domain. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;
12. Shimaoka M, Takagi J, Springer TA. Conformational Regulation of Integrin Structure and Function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2002;
13. Barthel SR, Johansson MW, McNamee DM, Mosher DF. Roles of integrin activation in eosinophil function and the eosinophilic inflammation of asthma. *J Leukoc Biol.* 2007;
14. Ruoslahti E. RGD AND OTHER RECOGNITION SEQUENCES FOR INTEGRINS. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996;
15. Integrin Subunit Interactions. 2007;2007–2007.
16. Imai Y, Park EJ, Peer D, Peixoto A, Cheng G, Von Andrian UH, et al. Genetic perturbation of the putative cytoplasmic membrane-proximal salt bridge aberrantly activates  $\alpha$ 4integrins. *Blood.*

2008;

17. Bednarczyk JL, McIntyre BW. A monoclonal antibody to VLA-4 alpha-chain (CDw49d) induces homotypic lymphocyte aggregation. *J Immunol.* 1990;
18. Evans R, Patzak I, Svensson L, De Filippo K, Jones K, McDowall A, et al. Integrins in immunity. *J Cell Sci.* 2009;
19. Angel CE, Chen CJJ, Horlacher OC, Winkler S, John T, Browning J, et al. Distinctive localization of antigen-presenting cells in human lymph nodes. *Blood.* 2009;
20. Cyster JG. CHEMOKINES, SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE, AND CELL MIGRATION IN SECONDARY LYMPHOID ORGANS. *Annu Rev Immunol.* 2005;
21. Kinashi T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nature Reviews Immunology.* 2005.
22. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: Three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell.* 1991.
23. Abbas, Abul; Abbas A. *Imunologia - Abbas 7<sup>a</sup> Ed.pdf.* 2012. p. 560.
24. Tanaka Y. Integrin activation by chemokines: Relevance to inflammatory adhesion cascade during T cell migration. *Histology and Histopathology.* 2000.
25. Tsuzuki Y, Miura S, Suematsu M, Kurose I, Shigematsu T, Kimura H, et al.  $\alpha$ 4 integrin plays a critical role in early stages of T lymphocyte migration in Peyer's patches of rats. *Int Immunol.* 1996;
26. Scholer A, Hugues S, Boissonnas A, Fetler L, Amigorena S. Intercellular Adhesion Molecule-1-Dependent Stable Interactions between T Cells and Dendritic Cells Determine CD8<sup>+</sup> T Cell Memory. *Immunity.* 2008;
27. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular. Imunologia Celular e Molecular.* 2012.
28. Van Seventer G a, Shimizu Y, Horgan KJ, Shaw S. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J Immunol.* 1990;
29. Mittelbrunn M, Molina A, Escribese MM, Yanez-Mo M, Escudero E, Ursa A, et al. VLA-4 integrin concentrates at the peripheral supramolecular activation complex of the immune synapse and drives T helper 1 responses. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;
30. Jay S. Desgrosellier, Cherech DA. Integrins in cancer: biological implications in therapeutic opportunities. *Cancer, Nat Rev.* 2015;
31. Shalapour S, Hof J, Kirschner-Schwabe R, Bastian L, Eckert C, Prada J, et al. High VLA-4

- expression is associated with adverse outcome and distinct gene expression changes in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia at first relapse. *Haematologica*. 2011;
32. Albelda SM, Mette SA, Elder DE, Stewart RM, Damjanovich L, Herlyn M, et al. Integrin Distribution in Malignant Melanoma: Association of the  $\beta 3$  Subunit with Tumor Progression. *Cancer Res*. 1990;
  33. Hsu MY, Shih DT, Meier FE, Van Belle P, Hsu JY, Elder DE, et al. Adenoviral gene transfer of  $\beta 3$  integrin subunit induces conversion from radial to vertical growth phase in primary human melanoma. *Am J Pathol*. 1998;
  34. Hieken TJ, Ronan SG, Farolan M, Shilkaitis AL, Das Gupta TK. Molecular prognostic markers in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. *Cancer*. 1999;85(2):375–82.
  35. Danen EH, Berge PJ, van Muijen GN, Van 't Hof-Grootenboer AE, BrAcker EB, Ruiter DJ. Emergence of alpha 5 beta 1 fibronectin- and alpha v beta 3 vitronectin-receptor expression in melanocytic tumour progression. *Histopathology*. 1994;
  36. Nip J, Shibata H, Loskutoff DJ, Cheresch DA, Brodt P. Human melanoma cells derived from lymphatic metastases use integrin  $\alpha \beta 3$  to adhere to lymph node vitronectin. *J Clin Invest*. 1992;
  37. Diaz LK, Cristofanilli M, Zhou X, Welch KL, Smith TL, Yang Y, et al.  $\beta 4$  Integrin subunit gene expression correlates with tumor size and nuclear grade in early breast cancer. *Mod Pathol*. 2005;
  38. Friedrichs K, Ruiz P, Franke F, Gille I, Terpe HJ, Imhof BA. High Expression Level of  $\alpha 6$  Integrin in Human Breast Carcinoma Is Correlated with Reduced Survival. *Cancer Res*. 1995;
  39. Takayama S, Ishii S, Ikeda T, Masamura S, Doi M, Kitajima M. The relationship between bone metastasis from human breast cancer and integrin  $\alpha \beta 3$  expression. *Anticancer Res*. 2005;
  40. Liapis H, Flath A, Kitazawa S. Integrin  $\alpha \beta 3$  Expression by Bone-residing Breast Cancer Metastases. *Diagnostic Mol Pathol*. 1996;
  41. Sloan EK, Pouliot N, Stanley KL, Chia J, Moseley JM, Hards DK, et al. Tumor-specific expression of  $\alpha \beta 3$  integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone. *Breast Cancer Res*. 2006;
  42. Felding-Habermann B, O'Toole TE, Smith JW, Fransvea E, Ruggeri ZM, Ginsberg MH, et al. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;
  43. McCabe NP, De S, VasANJI A, Brainard J, Byzova T V. Prostate cancer specific integrin  $\alpha \beta 3$  modulates bone metastatic growth and tissue remodeling. *Oncogene*. 2007;
  44. Hosotani R, Kawaguchi M, Masui T, Koshiha T, Ida J, Fujimoto K, et al. Expression of integrin alphaVbeta3 in pancreatic carcinoma: relation to MMP-2 activation and lymph node metastasis.

- Pancreas. 2002;
45. Slack-Davis JK, Atkins KA, Harrer C, Daniel Hershey E, Conaway M. Vascular cell adhesion molecule-1 is a regulator of ovarian cancer peritoneal metastasis. *Cancer Res.* 2009;
  46. Landen CN, Kim T-J, Lin YG, Merritt WM, Kamat AA, Han LY, et al. Tumor-Selective Response to Antibody-Mediated Targeting of  $\alpha v \beta 3$  Integrin in Ovarian Cancer. *Neoplasia* [Internet]. 2008;10(11):1259–67. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1476558608800231>
  47. Gruber G, Hess J, Stiefel C, Aebersold DM, Zimmer Y, Greiner RH, et al. Correlation between the tumoral expression of  $\beta 3$ -integrin and outcome in cervical cancer patients who had undergone radiotherapy. *Br J Cancer.* 2005;
  48. Hazelbag S, Kenter GG, Gorter A, Dreef EJ, Koopman LA, Violette SM, et al. Overexpression of the  $\alpha v \beta 6$  integrin in cervical squamous cell carcinoma is a prognostic factor for decreased survival. *J Pathol.* 2007;
  49. Bello L, Francolini M, Marthyn P, Zhang J, Carroll RS, Nikas DC, et al.  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha v \beta 5$  integrin expression in glioma periphery. *Neurosurgery.* 2001;
  50. Adachi M, Taki T, Higashiyama M, Kohno N, Inufusa H, Miyake M. Significance of integrin  $\alpha 5$  gene expression as a prognostic factor in node-negative non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;
  51. Bates RC, Bellovin DI, Brown C, Maynard E, Wu B, Kawakatsu H, et al. Transcriptional activation of integrin  $\beta 6$  during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. *J Clin Invest.* 2005;
  52. Pylayeva Y, Gillen KM, Gerald W, Beggs HE, Reichardt LF, Giancotti FG. Ras- and PI3K-dependent breast tumorigenesis in mice and humans requires focal adhesion kinase signaling. *J Clin Invest.* 2009;119(2):252–66.
  53. Fransvea E, Mazzocca A, Antonaci S, Giannelli G. Targeting transforming growth factor (TGF)- $\beta$ RI inhibits activation of  $\beta 1$  integrin and blocks vascular invasion in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2009;
  54. Munger JS, Pittet J-F, Kaminski N, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJD, et al. The Integrin  $\alpha v \beta 6$  Binds and Activates Latent TGF $\beta$ 1: A Mechanism for Regulating Pulmonary Inflammation and Fibrosis. *Cell.* 1999;
  55. Marsh D, Dickinson S, Neill GW, Marshall JF, Hart IR, Thomas GJ.  $\alpha v \beta 6$  integrin promotes the invasion of morphoeic basal cell carcinoma through stromal modulation. *Cancer Res.* 2008;
  56. Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, Erridge SC, Perry J, Hong YK, et al. Cilengitide combined with

- standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014;
57. Frisch SM, Ruoslahti E. Integrins and anoikis. *Current Opinion in Cell Biology.* 1997.
  58. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol.* 1994;
  59. Wendt MK, Drury LJ, Vongsa RA, Dwinell MB. Constitutive CXCL12 Expression Induces Anoikis in Colorectal Carcinoma Cells. *Gastroenterology.* 2008;
  60. Meredith JE, Fazeli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell.* 1993;
  61. Frisch SM, Vuori K, Ruoslahti E, Chan-Hui PY. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol.* 1996;
  62. Vachon PH. Integrin Signaling, Cell Survival, and Anoikis: Distinctions, Differences, and Differentiation. *J Signal Transduct.* 2011;
  63. Melino G. The Sirens' song. Vol. 412, *Nature.* 2001. p. 23.
  64. Kroemer G, Knight RA, Galluzzi L, Lipton SA, Vandenabeele P, Abrams JM, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* [Internet]. 2009;16(1):3–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18846107>
  65. Kroemer G, Knight RA, Galluzzi L, Lipton SA, Vandenabeele P, Abrams JM, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16(1):3–11.
  66. Emanuele S, Oddo E, D'Anneo A, Notaro A, Calvaruso G, Lauricella M, et al. Routes to cell death in animal and plant kingdoms: from classic apoptosis to alternative ways to die—a review. *Rendiconti Lincei.* 2018.
  67. Nicotera P, Melino G. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. Vol. 23, *Oncogene.* 2004. p. 2757–65.
  68. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences.* 2007.
  69. Nicotera P, Bernassola F, Melino G. Nitric oxide (NO), a signaling molecule with a killer soul. *Cell Death and Differentiation.* 1999;
  70. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule.

- Nat Immunol. 2000;1(6):489–95.
71. Mizushima N, Klionsky DJ. Protein Turnover Via Autophagy: Implications for Metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2007;
  72. Dunn WA, Cregg JM, Kiel JAKW, van der Klei IJ, Oku M, Sakai Y, et al. Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes. *Autophagy.* 2005.
  73. Parzych KR, Klionsky DJ. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxid Redox Signal.* 2014;
  74. Massey AC, Zhang C, Cuervo AM. Chaperone-Mediated Autophagy in Aging and Disease. *Current Topics in Developmental Biology.* 2006.
  75. Orenstein SJ, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: Molecular mechanisms and physiological relevance. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 2010.
  76. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: Core molecular machinery and signaling regulation. *Current Opinion in Cell Biology.* 2010.
  77. Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy.* 2011.
  78. Yang Z, Huang J, Geng J, Nair U, Klionsky DJ. Atg22 Recycles Amino Acids to Link the Degradative and Recycling Functions of Autophagy. *Mol Biol Cell.* 2006;
  79. Van Limbergen J, Stevens C, Nimmo ER, Wilson DC, Satsangi J. Autophagy: From basic science to clinical application. *Mucosal Immunology.* 2009.
  80. Yan Y, Backer JM. Regulation of class III (Vps34) PI3Ks. *Biochem Soc Trans.* 2007;
  81. Liu Z, Lenardo MJ. Reactive Oxygen Species Regulate Autophagy through Redox-Sensitive Proteases. *Developmental Cell.* 2007.
  82. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: Cellular and molecular mechanisms. *Journal of Pathology.* 2010.
  83. Crotzer VL, Blum JS. Autophagy and Its Role in MHC-Mediated Antigen Presentation. *J Immunol.* 2009;
  84. Zhou D, Li P, Lin Y, Lott JM, Hislop AD, Canaday DH, et al. Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity.* 2005;
  85. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239–57.
  86. Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death and Differentiation.* 1998.
  87. Senichkin V V., Kopeina GS, Zamaraev A V., Lavrik IN, Zhivotovsky BD. Nutrient restriction

- in combinatory therapy of tumors. *Mol Biol.* 2016;
88. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases: Linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell.* 2004.
  89. Wilhelm S, Wagner H, Häcker G. Activation of caspase-3-like enzymes in non-apoptotic T cells. *Eur J Immunol.* 1998;
  90. Kennedy NJ, Kataoka T, Tschopp J, Budd RC. Caspase Activation Is Required for T Cell Proliferation. *J Exp Med.* 2002;
  91. Tait SWG, Green DR. Caspase-independent cell death: Leaving the set without the final cut. Vol. 27, *Oncogene.* 2008. p. 6452–61.
  92. Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: Apoptosomes or mitochondria? *Genes to Cells.* 1998.
  93. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 2000;
  94. Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J.* 2001;
  95. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997;
  96. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology.* 2007.
  97. Hsu H, Xiong J, Goeddel D V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- $\kappa$ B activation. *Cell.* 1995;
  98. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 1995;
  99. Stupack DG, Puente XS, Boutsaboualoy S, Storgard CM, Cheresch DA. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol.* 2001;
  100. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell.* 1994.
  101. Shimizu Y, Van Severter GA, Horgan KJ, Shaw S. Regulated expression and binding of three VLA ( $\beta$ 1) integrin receptors on T cells. *Nature.* 1990;
  102. Yang XD, Karin N, Tisch R, Steinman L, McDevitt HO, McDevitt HO. Inhibition of insulinitis and prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by blocking L-selectin and very late

- antigen 4 adhesion receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;
103. Ghosh S, Goldin E, Gordon FH, Malchow HA, Rask-Madsen J, Rutgeerts P, et al. Natalizumab for Active Crohn's Disease. *N Engl J Med*. 2003;
  104. Gahmberg CG, Fagerholm SC, Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, Grönholm M. Regulation of integrin activity and signalling. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 2009.
  105. Kanehisa M, Goto S. KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. 2000;28(1):27–30.
  106. Yamada KM, Olden K. Fibronectins- Adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature*. 1978;275(5677):178.
  107. George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes RO. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development*. 1993;
  108. PISANI G, PISANI C. Considerazioni sugli aspetti pneumo- ed elettroencefalografici della porencefalia. *Minerva Med*. 1953;44(59–60):245–7.
  109. To WS, Midwood KS. Plasma and cellular fibronectin: Distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis and Tissue Repair*. 2011.
  110. Komoriya A, Green LJ, Mervic M, Yamada SS, Yamada KM, Humphries MJ. The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. *J Biol Chem*. 1991;266(23):15075–9.
  111. Mould AP, Komoriya A, Yamada KM, Humphries MJ. The CS5 peptide is a second site in the IIIICS region of fibronectin recognized by the integrin  $\alpha 4\beta 1$ : Inhibition of  $\alpha 4\beta 1$  function by RGD peptide homologues. *J Biol Chem*. 1991;266(6):3579–85.
  112. Mould a P, Humphries MJ. Identification of a novel recognition sequence for the integrin alpha 4 beta 1 in the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *EMBO J*. 1991;10(13):4089–95.
  113. Weber C, Springer TA. Interaction of very late antigen-4 with VCAM-1 supports transendothelial chemotaxis of monocytes by facilitating lateral migration. *J Immunol*. 1998;
  114. Polte T. Structural and Functional Studies of Full-Length Vascular Cell Adhesion Molecule-1: Internal Duplication and Homology to Several Adhesion Proteins. *DNA Cell Biol*. 1991;
  115. Chigaev A, Blenc AM, Braaten J V., Kumaraswamy N, Kepley CL, Andrews RP, et al. Real time analysis of the affinity regulation of  $\alpha 4$ -integrin: The physiologically activated receptor is intermediate in affinity between resting and  $Mn^{2+}$  or antibody activation. *J Biol Chem*. 2001;
  116. Osborn L, Vassallo C, Benjamin CD. Activated endothelium binds lymphocytes through a novel

- binding site in the alternately spliced domain of vascular cell adhesion molecule-1. *J Exp Med.* 1992;
117. Kilger G, Needham LA, Nielsen PJ, Clements J, Vestweber D, Holzmann B. Differential regulation of  $\alpha 4$  integrin-dependent binding to domains 1 and 4 of vascular cell adhesion molecule-1. Vol. 270, *Journal of Biological Chemistry.* 1995. p. 5979–84.
  118. Liu S, Kiosses WB, Rose DM, Slepak M, Salgia R, Griffin JD, et al. A fragment of paxillin binds the  $\alpha 4$  integrin cytoplasmic domain (tail) and selectively inhibits  $\alpha 4$ -mediated cell migration. *J Biol Chem.* 2002;
  119. European Medicines Agency. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Off J Eur Union.* 2010;
  120. Stein L. Genome annotation: From sequence to biology. *Nature Reviews Genetics.* 2001.
  121. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: Tool for the unification of biology. *Nature Genetics.* 2000.
  122. Kim JH. Bioinformatics and genomic medicine. In: *Genetics in Medicine.* 2002.
  123. Chandra N, Anand P, Yeturu K. Structural bioinformatics: Deriving biological insights from protein structures. *Interdiscip Sci Comput Life Sci.* 2010;
  124. Anderson AC. The process of structure-based drug design. *Chemistry and Biology.* 2003.
  125. Calixto JB, Jr JMS. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil : Desafios The. *Gazeta Médica da Bahia.* 2008.
  126. FDA. Drugs@FDA: FDA approved drug products. Drugs@FDA [Internet]. Silver Spring (MD): U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. 1939- [cited 2014 September 14]. Available from: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>. 2014.
  127. Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics — Drug Disposition, Drug Targets, and Side Effects. *N Engl J Med.* 2003;
  128. Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and Individualized Drug Therapy. *Annu Rev Med.* 2006;
  129. Gonzalez FJ, Skodot RC, Kimura S, Umeno M, Zanger UM, Nebert DW, et al. Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature.* 1988;
  130. Drews J. Genomic sciences and the medicine of tomorrow. *Nat Biotechnol.* 1996;
  131. Zhou F, Huang X, Zhang Z, Chen Y, Liu X, Xing J, et al. Functional polymorphisms of ITGB1 are associated with clinical outcome of Chinese patients with resected colorectal cancer. *Cancer*

- Chemother Pharmacol. 2015;
132. Durmanova V, Parnicka Z, Javor J, Minarik G, Vrazda L, Vaseckova B, et al. A novel association of polymorphism in the ITGA4 Gene Encoding the VLA-4  $\alpha$ 4 subunit with increased risk of Alzheimer's disease. *Mediators Inflamm.* 2018;
  133. James Kent W, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002;
  134. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* 2013;
  135. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* (80- ). 2013;
  136. Schneider U, Schwenk H -U, Bornkamm G. Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer.* 1977;
  137. Bratton PM, Henson VA, Fadok DR, Voelker PA, Campbell JJ, Cohen DL, et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* 1992;
  138. Crowley LC, Scott AP, Marfell BJ, Boughaba JA, Chojnowski G, Waterhouse NJ. Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;
  139. Yue P, Moulton J. Identification and analysis of deleterious human SNPs. *J Mol Biol.* 2006;
  140. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet.* 2013;
  141. Van Zundert GCP, Rodrigues JPGLM, Trellet M, Schmitz C, Kastiris PL, Karaca E, et al. The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *J Mol Biol.* 2016;
  142. Laborclin. Panótico rápido lb. 2003;2–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8939387>
  143. Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research.* 1999.
  144. LaFlamme SE, Nieves B, Colello D, Reverte CG. Integrins as regulators of the mitotic machinery. *Current Opinion in Cell Biology.* 2008.
  145. Gonzalez-Polo R-A. The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci.* 2005;
  146. Rasband W, Ferreira T. ImageJ User Guide User Guide ImageJ. 2014;198.

147. Homma K, Suzuki K, Sugawara H. The autophagy database: An all-inclusive information resource on autophagy that provides nourishment for research. *Nucleic Acids Res.* 2011;
148. Drozdetskiy A, Cole C, Procter J, Barton GJ. JPred4: A protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* 2015;
149. Buchan DWA, Minneci F, Nugent TCO, Bryson K, Jones DT. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Res.* 2013;
150. McConkey BJ, Sobolev V, Edelman M. The performance of current methods in ligand-protein docking. *Curr Sci.* 2002;
151. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. MTOR regulation of autophagy. *FEBS Letters.* 2010.
152. Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B. RIP: A novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell.* 1995;
153. McComb S, Mulligan R, Sad S. Caspase-3 is transiently activated without cell death during early antigen driven expansion of CD8+ T cells in vivo. *PLoS One.* 2010;
154. Janzen V, Fleming HE, Riedt T, Karlsson G, Riese MJ, Lo Celso C, et al. Hematopoietic Stem Cell Responsiveness to Exogenous Signals Is Limited by Caspase-3. *Cell Stem Cell.* 2008;
155. Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, et al. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and A $\beta$ -induced cell death. *J Cell Biol.* 2004;
156. Bursch W. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation.* 2001.
157. Grishchuk Y, Ginet V, Truttmann AC, Clarke PGH, Puyal J. Beclin 1-independent autophagy contributes to apoptosis in cortical neurons. *Autophagy.* 2011;7(10):1115–31.
158. Airiau K, Djavaheri-Mergny M. Chapter 4 - Cross-Talk Between Autophagy and Death Receptor Signaling Pathways A2 - Hayat, M.A. BT - Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging [Internet]. 10th ed. Vol. 10, Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging. Elsevier Inc.; 2016. 119-133 p. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128054215000045>
159. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2008.
160. Heras-Sandoval D, Pérez-Rojas JM, Hernández-Damián J, Pedraza-Chaverri J. The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. *Cellular Signalling.* 2014.

161. Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh Y. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria. *J Biol Chem.* 2002;
162. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Xiao HL, Mizushima N, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell.* 2005;
163. Teng X, Dayhoff-Brannigan M, Cheng WC, Gilbert CE, Sing CN, Diny NL, et al. Genome-wide consequences of deleting any single gene. *Mol Cell.* 2013;
164. Freire-de-Lima L. Sweet and Sour: The Impact of Differential Glycosylation in Cancer Cells Undergoing Epithelialâ€“Mesenchymal Transition. *Front Oncol.* 2014;