

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**EFEITO DA rACLF, UMA METALOPEPTIDASE
RECOMBINANTE DA PEÇONHA DE *Agkistrodon contortrix*
laticinctus, NA VIABILIDADE CELULAR, EXPRESSÃO DE
CITOCINAS E DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MATRIZ
EXTRACELULAR**

CAROLINE KRIEGER DE MORAES

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Fisiológicas.

SÃO CARLOS, 2006

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

M827er

Moraes, Caroline Krieger de.

Efeito da rACLF, uma metalopeptidase recombinante da peçonha de *Agkistrodon contortrix laticinctus*, na viabilidade celular, expressão de citocinas e degradação de proteínas da matriz extracelular / Caroline Krieger de Moraes. -- São Carlos : UFSCar, 2006.

85 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Proteínas. 2. Matriz extracelular. 3. Células - morte. 4. Citocina. I. Título.

CDD: 574.19296 (20^a)

Agradecimentos

À Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo, orientadora que admiro muito, agradeço a oportunidade pelo valioso aprendizado.

À Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza, à Dra. Mônica Costa Iemma e ao Dr. Flávio Henrique da Silva, que participaram da minha banca de qualificação, agradeço as valiosas críticas e sugestões.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFSCar - Raquel A. Mesquita, Juliana U. Ribeiro, Carmen Lúcia Pontes, Rita de Cássia Marqueti, Mônica C. Iemma, Oscar H.P. Ramos, Márcia R Cominetti, Ademar de Souza Nogueira, e Irene do Carmo Guimarães, agradeço por toda a ajuda e companheirismo.

Às amigas Rita de Cássia Marqueti e Liliana Torcoroma Garcia Sanchez, sempre dispostas a me ajudar, agradeço pelo incentivo em todos os momentos deste trabalho.

Às amigas Anna Raquel Silveira Gomes e Ana Mery da Silva, obrigada pelo apoio e pelas horas de descontração.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas e Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

À Dra. Ana Marisa Chudzinski-Tavassi e ao Dr. Márcio Fritzen do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, e à Dra. Adriana Carmona e Dra. Patrícia Bersanetti da EPM - UNIFESP, pela colaboração.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

À minha família pela confiança e compreensão.

Ao meu marido Sandro, pelo seu amor, dedicação e incentivo.

Lista de abreviaturas

AH	Ácido hialurônico
ADAM	Proteína multimodular que apresenta os domínios metalopeptidase e tipo desintegrina (<i>A Desintegrin And Metallopeptidase</i>)
Abz	Ácido orto-aminobenzoil
ACL	<i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i> , uma serpente crotálica
ACLF	Proteína fibrinolítica não hemorrágica de ACL
rACLF	Proteína recombinante fibrinolítica não hemorrágica de ACL
ACLH	Proteína hemorrágica de ACL
Arg	Arginina
BSA	Soro Albumina Bovina
CAM	Molécula de adesão celular (<i>cell adhesion molecule</i>)
CE	Células endoteliais
C-terminal	Carboxi-terminal
COL	Domínio <i>collagenous</i> do colágeno
Cys	Cisteína
DAF	Decay Accelerating Factor
DMEM	Meio Dulbeco's modificado
DTT	Ditiotreitol
DO	Densidade óptica
EDDnp	Etilenodiamino-2,4-dinitrofenil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
ELR	Motivo Glu-Leu-Arg presente em algumas quimiocinas
FBS	Soro fetal bovino
fvW	fator de von Willebrand
GAGs	Glicosaminoglicanas
Glu	Ácido glutâmico
GRO	Oncogene regulado por crescimento (<i>growth regulated oncogene</i>)
His	Histidina
HSPGs	Proteoglicanas heparan sulfato (<i>heparan sulfate proteoglicans</i>)
HUVEC	Células endoteliais da veia de cordão umbilical humano
IL	Interleucina
ICAM	Molécula de Adesão Intracelular
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
LB	Meio Luria Bertani
Leu	Leucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimiotática de macrófagos
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metalopeptidase de matriz

MTT	[3-(4,5-dimetil) tiazol-2-il 2,5-difenil brometo de tetrazólio]
NC	Domínio <i>noncollagenous</i> do colágeno
NO	Óxido Nítrico (<i>Nitric oxide</i>)
PARP	(Poly[ADP-ribose] Polymerase)
PBS	Tampão fosfato salina
PGI ₂	Prostaciclina
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (dodecil sulfato de sódio)
SVMP	Metalopeptidase de peçonha de serpente
TGF- β	Fator de crescimento transformante do tipo beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral do tipo alfa
TIMP	Inibidor tecidual de metalopeptidase
Tsp	Trombospondina
VEGF	Fator de crescimento de endotélio de vasos
UAF	Unidade Arbitrária de fluorescência

Aminoácidos e seus símbolos

Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Arginina	Arg	R
Lisina	Lys	K
Histidina	His	H
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Tirosina	Tyr	Y
Alanina	Ala	A
Glicina	Gly	G
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	I
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Metionina	Met	M
Triptofano	Trp	W
Cisteína	Cys	C



polar negativamente carregado



não-carregado



polar positivamente carregado



não polar

Lista de figuras

Figura 1. Classificação das metalopeptidases.	3
Figura 2. Representação da estrutura dos domínios da fibronectina.	15
Figura 3. Representação esquemática da estrutura modular e funções da TSP-1.	18
Figura 4. Representação esquemática da estrutura da laminina-1 e seus domínios de ligação.	20
Figura 5 Ensaio de expressão e solubilidade da pró-rACLF em <i>E.coli</i>	44
Figura 6 Ativação da pró-rACLF.	45
Figura 7. Inibição da apoptose em HUVECs mediada por rACLF.	47
Figura 8. Expressão de ICAM-1 induzida por rACLF.	48
Figura 9. Produção de interleucina-8 pelas HUVECs.	49
Figura 10. Produção de PGI2 pelas HUVECs.	50
Figura 11. Expressão de DAF induzida por rACLF.	51
Figura 12. Viabilidade de fibroblastos humanos tratados com rACLF.	52
Figura 13. Análise morfológica de fibroblastos humanos.	52
Figura 14. Zimograma em gelatina.	53
Figura 15. Identificação de MMP-2 secretada nos sobrenadantes de fibroblastos incubados com rACLF por 48h.	53
Figura 16. Representação dos anticorpos anti-citocinas ligados à membrana.	54
Figura 17. Detecção de citocinas secretadas por fibroblastos humanos.	54
Figura 18. Efeito de diferentes concentrações de rACLF na viabilidade de células HeLa.	55
Figura 19. Morfologia de HeLa tratadas com rACLF.	56
Figura 20. Zimograma em gelatina.	56

Figura 21. Efeito de diferentes concentrações de rACLF na viabilidade de células MDA-MB 231	57
Figura 22. Efeito de diferentes concentrações de rACLF na viabilidade de células MCF-7	58
Figura 23. Degradação da laminina pela rACLF.	59
Figura 24. Degradação da fibronectina pela rACLF.	60
Figura 25. Degradação da TSP pela rACLF.....	60
Figura 26. Degradação do colágeno IV pela rACLF.....	61
Figura 27. Efeito de diferentes concentrações de rACLH na viabilidade de fibroblastos humanos.....	62
Figura 28. Efeito de diferentes concentrações de rACLH na viabilidade de células HeLa	62
Figura 29. Efeito de diferentes concentrações de rACLH na viabilidade de células MDA-MB 231	63
Figura 30. Efeito de diferentes concentrações de rACLH na viabilidade de células MCF-7.	63
Figura 31. Degradação da pró-insulina por rACLF (1) e rACLH (2).	65

Lista de tabelas

Tabela 1. Famílias de metalopeptidases e seus motivos de ligação ao zinco.....	2
Tabela 2. Família das metalopeptidases de matriz e seus substratos.....	4
Tabela 3. Principais tipos e distribuição de colágenos.....	14
Tabela 4. Quimioquinas CXC que regulam a angiogênese.....	25
Tabela 5. Proliferação de HUVECs em RPMI (10% SFB).....	46
Tabela 6. Indução de apoptose em HUVECs por rACLF.....	46
Tabela 7. Parâmetros cinéticos para a hidrólise de substratos de fluorescência apagada pela rACLF.....	65

Sumário

1. Introdução	1
1.1 Metalopeptidases	1
1.2 Metalopeptidases de Matriz Extracelular (MMPs).....	4
1.3 Metalopeptidases de peçonha de serpentes (SVMPs)	6
1.4 Matriz Extracelular (MEC).....	10
1.5 Constituição da MEC	13
1.5.1 Colágenos	13
1.5.2 Fibronectina	15
1.5.3 Trombospondinas	16
1.5.4 Lamininas	19
1.5.6 Proteoglicanas.....	21
1.6. Citocinas	22
1.6.1 Quimiocinas.....	23
1.7. Endotélio Vascular	25
1.8 Apoptose.....	27
1.9 Resultados anteriores.....	30
2. Objetivos.....	32
3. Materiais e Métodos	33
3.1 Expressão e purificação da ACLF recombinante (rACLF).....	33
3.2 Purificação da rACLF.....	33
3.3. Enovelamento in vitro	34
3.4. Determinação da concentração protéica.....	34
3.5 Linhagens celulares utilizadas	35
3.6 Estudos com HUVECs	35
3.6.1 Cultivo das células.....	35
3.6.2 Ensaio de proliferação celular	36
3.6.3 Detecção de efeito apoptótico da rACLF em HUVECs.....	36
3.6.4 Detecção de efeito antiapoptótico da rACLF	37
3.6.5 Expressão de ICAM e DAF.....	38
3.6.6 Liberação de Prostaglandina I ₂ (PGI ₂)	38
3.6.7 Liberação de IL-8	39
3.7 Estudos com HeLa, fibroblastos humanos e MDA-MB-231 e MCF-7)	39
3.7.1 Ensaio de viabilidade celular.....	39
3.7.2 Zimografia	40

3.7.3 Western blot para análise de MMPs	41
3.7.4 Expressão de citocinas	41
3.7.5 Atividade proteolítica da rACLF sobre componentes da matriz extracelular. ...	42
3.7.6 Atividades sobre pró-insulina recombinante porcina	42
3.7.7 Atividade proteolítica da rACLF sobre os substratos sintéticos.....	42
3.7.8 Análise estatística	43
4. Resultados.....	44
4.1 Expressão, purificação e ativação da rACLF	44
4.2 Efeito da rACLF sobre a proliferação de células endoteliais	45
4.3 Apoptose induzida por rACLF em células endoteliais.....	46
4.4 Inibição de apoptose de células endoteliais induzida rACLF.....	47
4.5 Efeito rACLF sobre a expressão de ICAM-1	47
4.6 Efeito rACLF na secreção de Interleucina-8	48
4.7 Efeito rACLF na secreção de Prostaglandina PGI2	49
4.8 Efeito da rACLF na expressão de DAF (fator de aceleração do decaimento)	50
4.9 Efeito da rACLF em fibroblastos humanos.....	51
4.10 Detecção de citocinas/quimiocinas no sobrenadante de fibroblastos humanos incubados com rACLF.	54
4.11 Efeito da rACLF em células tumorais HeLa	55
4.12 Efeito da rACLF em células tumorais MDA- MB-231 e MCF-7	57
4.13 Atividade da rACLF sobre proteínas da matriz extracelular: laminina, fibronectina, trombospondina e colágeno IV.....	58
4.14 Efeito da rACLH em células normais e tumorais.....	61
4.15 Parâmetros cinéticos para a hidrólise do substrato Abz-LVEALYQ-EDDnp pelas enzimas rACLF e rACLH.....	64
4.16 Atividade proteolítica da rACLF sobre substratos fluorogênicos	64
4.17 Atividade proteolítica da rACLF, e rACLH sobre pró-insulina.....	65
5. Discussão	66
6. Conclusões e perspectivas	74
7. Referências Bibliográficas.....	76
Anexos.....	86

Resumo

A ACLF é uma metalopeptidase da peçonha da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*. A ACLF é sintetizada na forma de zimogênio (pró-ACLF) com 412 aminoácidos, enquanto a sua forma ativa possui 222 aminoácidos. A fase aberta de leitura que codifica para a peptidase foi isolada (de uma biblioteca de cDNA feita a partir da glândula venenífera da serpente) e caracterizada. Este trabalho apresenta os efeitos da rACLF em células endoteliais (HUVECs), tumorais (HeLa, MDA-MB-231 e MCF-7) e não-tumorais (fibroblastos), bem como a atividade proteolítica da enzima sobre proteínas da matriz extracelular, como colágeno, fibronectina, laminina e trombospondina. Nossos resultados demonstraram que a rACLF inibiu a apoptose induzida por privação de soro fetal bovino em HUVECs, mas não foi capaz de induzir a proliferação celular. A rACLF apresentou efeito direto sobre as células endoteliais, aumentando a liberação de IL-8, além de induzir a expressão de moléculas envolvidas na adesão celular e reposta inflamatória. A rACLF e a rACLH não foram citotóxicas para fibroblastos humanos. Por outro lado as duas enzimas estudadas causaram redução na viabilidade alteração na morfologia e desgrudamento em células HeLa. Em fibroblastos, a rACLF modulou a expressão das quimoquinas CXC, IL-8 e GRO e CC, MCP1. Nos sobrenadantes de fibroblastos e HeLa incubados com rACLF por 48 h não foi observada diferença na secreção de MMP-2 (gelatinase-A). A rACLF apresentou atividade sobre proteínas da matriz extracelular, como laminina, fibronectina, colágeno IV e trombospondina. A rACLF também hidrolisou alguns substratos fluorogênicos e foi mais eficiente na hidrólise do substrato correspondente ao peptídeo central da cadeia β da insulina, quando comparada com a rACLH. Os resultados deste trabalho contribuíram para melhor entendimento dos efeitos da proteína estudada sobre diferentes linhagens celulares e abrem perspectivas para novos estudos voltados à elucidação dos mecanismos de regulação e sinalização afetados pela atividade da proteína.

Abstract

ACLF is a fibrinolytic non-hemorrhagic metallopeptidase from the venom of the snake *Agkistrodon contortrix laticinctus*. rACLF is synthesized as a zymogen (pro-ACLF) with 412 aminoacids, while the active form of enzyme has 222 aminoacids. The ORF (open reading frame) that codes for the peptidase was isolated (from a cDNA venom gland library of *A. contortrix. laticinctus*) and characterized. This work shows the effects of rACLF on endothelial cells (HUVECs), tumor cells (HeLa, MDA-MB-231 and MCF-7) and non-tumor cell (fibroblast) as well its proteolytic activity on extracellular matrix proteins. Our results showed that rACLF inhibited the apoptosis induced by serum deprivation in HUVECs, but had no effect on cell proliferation. rACLF had direct effect on HUVECs, since it was observed an increased amount of IL-8 in the cell supernatants, in addition to the expression induction of molecules related to adhesion and inflammation processes. rACLF and rACLH were not cytotoxic to human fibroblasts. On the other hand, both proteins caused decrease of cell viability, changes in morphology, and detachment of HeLa cells. On human fibroblasts, rACLF modulated the expression of chemokines CXCL1, IL-8 and GRO, and chemokine CC, MCP1. The supernatant of human fibroblasts and HeLa cells were analyzed for MMP-2 (gelatinase-A) secretion. No difference was observed after 48 h incubation with rACLF and controls. rACLF presented hydrolytic activity on extracellular matrix proteins, such as laminin, fibronectin, collagen IV, and thrombospondin. Furthermore, hydrolytic activity on insulin β chain peptide was tested and compared to rACLH activity. rACLF was shown to be more efficient than rACLH on this substrate. In conclusion, the results of this study increased the knowledge on the protein effects on different cell lines and open up perspectives for new studies concerning signaling and regulation mechanisms affected by this protein activity.

1. Introdução

Os venenos de serpentes são compostos de uma variedade de proteínas, as quais são responsáveis por vários processos patológicos durante o envenenamento. Entretanto, o estudo destas proteínas vem demonstrando, que além de exercerem funções patológicas, muitas delas podem servir de ferramentas para processos terapêuticos. Neste contexto o Laboratório de Bioquímica vem estudando a ação de proteínas isoladas de venenos de serpentes e de seus domínios, com o objetivo de elucidar e compreender os vários processos celulares que podem ser desencadeados por estas proteínas, tais como proliferação, migração, adesão, necrose e apoptose.

As peçonhas de serpentes contêm compostos inorgânicos e orgânicos. Compostos inorgânicos como zinco, cobre, ferro e cobalto possuem função relacionada a mecanismos de catálise enzimática. Aproximadamente 95% do peso seco da peçonha é de origem protéica (BJARNASON E FOX, 1994). Dentre estas, as serino e metalopeptidases destacam-se por serem responsáveis pela maioria dos efeitos observados durante os envenenamentos.

1.1 Metalopeptidases

As metalopeptidases (MPs) (E.C. 3.4.24) são hidrolases do tipo endopeptidases que dependem da ligação de um metal, geralmente o zinco, em seu sítio catalítico para manifestação de suas atividades (BODE *et al.*, 1999). As MPs exercem funções em processos fisiológicos tais como angiogênese, fertilização, fusão de mioblastos e

remodelamento tecidual (VU & WERB, 2000). Porém, estão relacionadas à processos patológicos como câncer e artrite reumatóide (De CLERCK, 2000).

As metalopeptidases são enzimas encontradas em vários organismos vivos (GOMIS-RÜTH, 2003) e foram classificadas em quatro famílias, de acordo com a similaridade das seqüências (Tabela 1).

Tabela 1. Famílias de metalopeptidases e seus motivos de ligação ao zinco (Hooper, 1994).

Família	<i>Motivo de ligação ao zinco</i>
zincinas	HEXXH
inverzincinas	HXXEH
carboxipeptidase	HXXE
DD-carboxipeptidases	HXH

As zincinas formam o maior grupo, subdividido em gluzincinas (possuem Glu como terceiro ligante do zinco), aspzincinas (possuem um resíduo de aspartato como terceiro ligante do zinco) e metzincinas (possuem His como terceiro ligante do zinco) (Figura 1). As metzincinas possuem o motivo Met-turn, caracterizados pela presença de uma metionina (Met) em uma volta da estrutura terciária localizada C-terminalmente em relação ao motivo de ligação ao zinco. Estas peptidases apresentam uma seqüência consenso estendida de ligação ao zinco, HEXXHXXGXXH/D. Outras famílias estruturalmente caracterizadas incluem as astacinas, serralisinas, adamalisinas, MMPs, snapalisinas e leishmanolisinas (GOMIS-RÜTH, 2003).

As astacinas possuem um Glu imediatamente após o terceiro ligante do metal e participam de diversos processos biológicos, tais como remodelamento e diferenciação tecidual e ativação de fatores de crescimento (WEINMASTER, 1998). As reprotisinas

possuem um resíduo Asp após o terceiro ligante. Fazem parte desta família as ADAMs (*A Desintegrin And Metalopeptidases*), as ADAMST (ADAM com motivo tipo trombospondina) e as metalopeptidases presentes em peçonhas de serpentes SVMPs (*Snake Venom Metalopeptidases*) (DECLERCK, 2000).

As ADAMS são caracterizadas por apresentarem domínios de metaloprotease e desintegrina, uma região rica em cisteína, domínios contendo repetições EGF (epidermal growth factor), um domínio transmembrana e uma região citoplasmática. As ADAMs têm função na interação célula-célula, no processamento do ectodomínio de proteínas de superfície celular e na diferenciação de tecidos

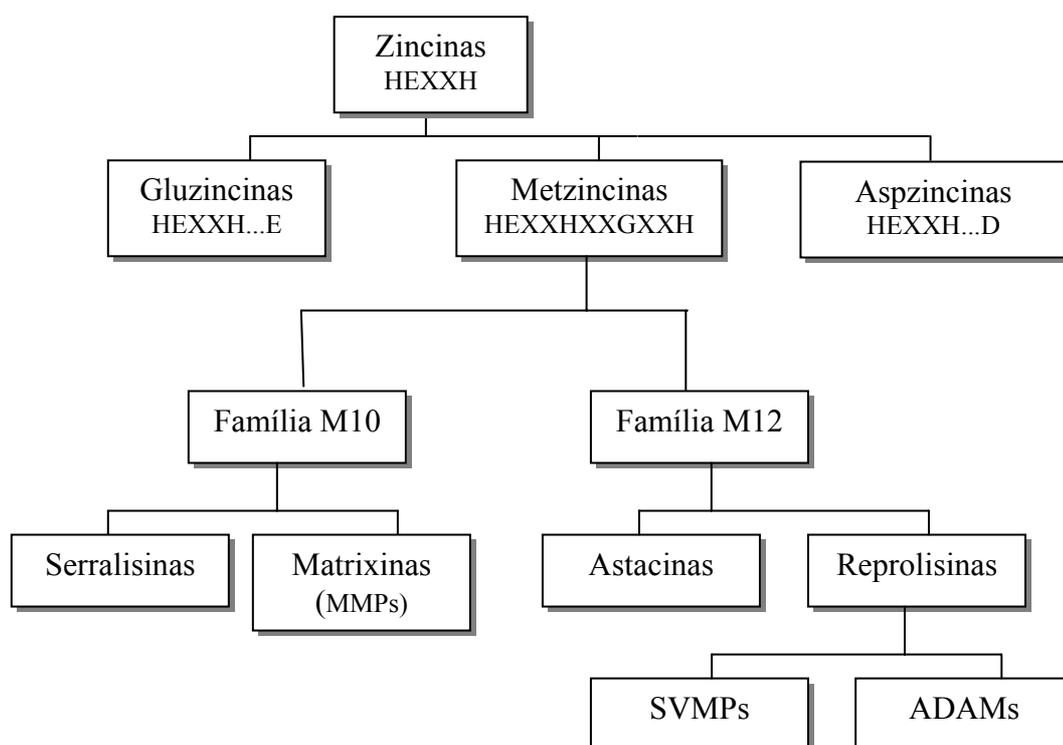


Figura 1. Classificação das metalopeptidases. Adaptado de De CLERCK, 2000, GOMES-RÜTH, 2003.

1.2 Metalopeptidases de Matriz Extracelular (MMPs)

As MMPs (Matrix Metalloproteases) são uma família com mais de vinte enzimas capazes de degradar componentes da matriz extracelular. Estas peptidases são secretadas na forma de zimogênio e requerem a ativação pela remoção do pró-domínio e dependem da ligação de Zn^{2+} para exercerem sua atividade (BIRKEDAL-HANSEN, 1995).

As MMPs foram organizadas em três grupos baseados na especificidade pelo substrato: **colagenases**, que atuam em colágenos fibrilares (tipo I, II e III), **gelatinases**, que rapidamente degradam colágeno desnaturado e de membrana basal (tipo IV) e **estromelisinases** que clivam o a proteína central de proteoglicanas e outras proteínas da matriz extracelular (LAUER-FILDS *et al.*, 2002).

Tabela 2. Família das metalopeptidases de matriz e seus substratos. Adaptado de STERNLICHT & WERB, 2001, MC QUIBBAN *et al.*, 2002.

MMP	Massa molecular	Substratos
MMP-1 (colagenase intersticial)	Pró- 57/54 kDa ativa- 46/42 kDa	Agrecan, col I, II, III, VII, VIII, X, XI, decorina, elastina, fibronectina, gelatina, entacina/nidogênio, tenascina, laminina, caseína, vitronectina, fibrina, fibrinogênio, Pró-TNF- α , MCP-1 a -4
MMP-13 (colagenase -3)	Pró- 60 kDa ativa- 48 kDa	Agrecan, col I, II, III, VI, IX, X, XIV, decorina, elastina, fibronectina, gelatina, entacina/nidogênio, fibrilina, laminina, tenascina, vitronectina, fibrina, fibrinogênio, Pro-TGF- β , Pró-TNF- α , substância
MMP-2 (gelatinase A)	Pró- 72 kDa ativa- 66 kDa	Agrecan, col I, III, IV, V, VII, X, XI, , fibronectina, gelatina, caseína, entacina/nidogênio, fibrilina, laminina, fibrinogênio, MCP-3
MMP-9 (gelatinase B)	Pró- 92 kDa ativa- 88 kDa	Agrecan, col IV, col V, col XI, col XIV, decorina, elastina, fibronectina, gelatina, entacina/nidogênio, laminina, caseína vitronectina, E-caderina, IL-1 β , fibrinogênio, Pro-TGF- β , Pró-TNF- α , substância P, MCP-3, IL-8
MMP-3 (estromelisinase)	Pró- 59 kDa	Agrecan, col III, IV, V, VII, IX, X, XI, decorina, elastina, fibronectina, gelatina, entacina/nidogênio, fibrilina, laminina, tenascina, vitronectina, fibrina, fibrinogênio, Pró-TNF- α , substância, MCP-1 a -4 Plasminogênio.
MMP-7 (<i>matrilisina</i>)	Pró- 28 kDa ativa- 18 kDa	Agrecan, col I, col IV, decorina, elastina, fibronectina, gelatina, entacina/nidogênio, laminina, tenascina, vitronectina, caseína, E-caderina, fibrinogênio, Pró-TNF- α , plasminogênio

Estas enzimas são ativas em pH neutro e requerem Ca^{2+} para sua completa atividade. Elas são especificamente inibidas por inibidores teciduais de MMPs, denominados TIMPs. Existem quatro TIMPs descritos (TIMP-1, -4), dentre os quais o TIMP-1 parece ser ubíquo (NGUYEN *et al.*, 2001).

A regulação da atividade das MMPs ocorre em vários estágios, incluindo a ativação e transcrição de genes, tradução e secreção da enzima latente, ativação da pró-enzima e inibição por inibidores endógenos (CURRAN & MURRAY, 2000). Dentre estes, os mais estudados são a regulação da transcrição, ativação de MMPs latentes e inibição por TIMPs (YE, 2000). Alguns genes de MMPs (MMP-1,-3,-7,-9,-10,-12 e -13) são induzíveis e apresentam um alto grau de conservação de elementos regulatórios na região promotora de seus genes (MAUVIEL *et al.*, 1992). O elemento AP-1 (*Activating Protein-1*) é necessário para a resposta transcricional a vários sinais, como interleucina-1 (IL-1), glicocorticóides e retinóis. Outro elemento *cis* atuante é o sítio PEA-3 (*Polyoma Enhancer Activator*), necessário tanto para a transcrição basal das peptidases, quanto para a *trans* ativação por ésteres de forbol, citocinas e fatores de crescimento (CURRAN & MURRAY, 2000).

A MMP-2 (gelatinase A) é a única dentre as MMPs que não possui uma seqüência no pró-domínio suscetível à ativação proteolítica por outras proteases como plasmina e tripsina. Além disso, diferente de outras MMPs onde a ativação ocorre no meio extracelular, a ativação da MMP-2 ocorre na membrana, via MT1-MMP (membrane-type MMP) (NGUYEN *et al.*, 2001).

A excessiva ou inapropriada expressão de MMPs contribui para a patogênese de muitos processos teciduais destrutivos, incluindo artrite reumatóide, esclerose múltipla e periodontite (KAPILA *et al.*, 1996; SHAPIRO, 1998). AS MMPs e os TIMPs também são reguladores essenciais durante a angiogênese, uma vez que as MMPs podem atuar como

pró-angiogênicas, pela liberação de fatores pró angiogênicos ligados à matriz extracelular, mas também podem atuar como anti-angiogênicas através da clivagem dos componentes da matriz extracelular em fatores anti-angiogênicos (KUO *et al.*, 2001). A angiostatina é um produto de clivagem do plasminogênio e a endostatina, que é o fragmento C-terminal do colágeno tipo XVIII, são exemplos de produtos liberados pela ação das MMPs, que inibem a angiogênese (O'REILLY *et al.*, 1997).

A expressão de MMPs também está associada com a ovulação, implantação uterina e involução da glândula mamária (HULBOY *et al.*, 1997). Entretanto, foi demonstrado que as MMPs facilitam a metástase das células, pela destruição da membrana basal e por promover a angiogênese, levando a progressão do tumor (COUSSENS & WERB, 1996). A gelatinase A (MMP-2) é altamente expressa por alguns tipos de células endoteliais, como glioblastomas (VINCE *et al.* 1999). A trombina, que é expressa em altos níveis em situações angiogênicas como câncer e artrite reumatóide, interage com a trombosmodulina na superfície de células endoteliais e ativa a proteína C. Esta por sua vez ativa gelatinase A latente, levando à disrupção do capilar e degradação da membrana basal (NGUYEN *et al.*, 2001).

A colagenase-3 (MMP-13) em condições fisiológicas tem função principalmente no remodelamento de tecidos e na embriogênese. Seu nível aumenta muito no pós-parto, durante a involução do útero. Em condições patológicas, a expressão da colagenase-3 está associada principalmente com artrite reumatóide e tumores.

1.3 Metalopeptidases de peçonha de serpentes (SVMPs)

Os envenenamentos pela maioria das serpentes norte americanas são causados por espécies da família *Viperidae*, gêneros *Crotalus*, *Sistrurus* e *Agkistrodon*, e são

caracterizados pelo rápido aparecimento de dor, bolhas, edema, necrose local e equimose. Em adição, as alterações sistêmicas incluem distúrbios da coagulação, hemorragia, distúrbios cardiovasculares e disfunção renal (GOLD *et al.*, 2002). No Brasil, o envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*, como a jararaca, induz um quadro fisiopatológico semelhante, sendo a hemorragia um dos efeitos mais pronunciados (BJARNASON E FOX, 1994).

As SVMPs são abundantes nas peçonhas das serpentes viperídicas, sendo responsáveis por diversos efeitos patológicos no sistema vascular (OWNBY, 1990, BJARNASON E FOX, 1994). As SVMPs digerem componentes da matriz extracelular, como colágeno, laminina, fibronectina, provocando hemorragia local e sistêmica nos envenenamentos crotálicos e viperídicos (BARAMOVA *et al.*, 1989).

Estas enzimas são sintetizadas na glândula venenífera como proteínas contendo múltiplos domínios, incluindo o domínio de pró-enzima e o domínio de zinco-protease, altamente conservado (SELISTRE DE ARAUJO *et al.*, 1997, FOX E SERRANO, 2005).

As SVMPs são agrupadas de acordo com a massa molecular e a estrutura de seus domínios em quatro classes (PI a PIV), (BJARNASON & FOX, 1994; JIA *et al.*, 1996). A classe P-I engloba as SVMPs pequenas, com massa molecular até 24 kDa e pouca atividade hemorrágica. A classe P-II engloba as proteínas de tamanho médio, que além do domínio catalítico, possuem um domínio desintegrina. Estas proteínas na sua forma ativa geralmente são processadas liberando desintegrinas livres (JIA *et al.*, 1996, 1997 FOX e SERRANO, 2005). As proteínas da classe P-III possuem além dos domínios catalítico e tipo desintegrina, um domínio rico em cisteína. Membros desta classe são potentes toxinas hemorrágicas e apresentam massa molecular por volta de 55 kDa. A classe P-IV abrange proteínas grandes (cerca de 95 kDa) com pouca atividade hemorrágica. Estruturalmente estas proteínas são similares as da classe P-III, mas possuem um domínio adicional tipo

lectina. A função biológica do domínio tipo desintegrina parece ser homóloga à dos peptídios desintegrina que apresentam uma seqüência RGD e que inibem a agregação plaquetária (ZHOU *et al.*, 1995).

Recentemente Fox e Serrano (2005) baseados na análise estrutural das SVMPs descreveram uma subdivisão para as classes PII e PIII, que reflete o potencial para o processamento proteolítico, bem como a formação de estruturas diméricas. A subclasse PIIa engloba toxinas que não possuem o domínio desintegrina processado do metalopeptidase e são monoméricas, como por exemplo a Jerdonitina e Agkistina (NIKAI *et al.*, 2003, CHEN *et al.*, 2003). Já a classe PIIb é representada por SVMPs com estrutura dimérica, como a Bilitoxina -1, em razão de resíduos cisteinil adicionais nas posições 65 e 237. Peptidases como a Acostatina-B, Contortrostatina e Lebetase, pertencem à classe PII e possuem o domínio desintegrina processado (FOX E SERRANO, 2005). A classe PIIIa classifica as peptidases que podem sofrer proteólise, resultando na liberação de dois domínios, o metalopeptidase e o desintegrina símile/ rico em cisteína. Entretanto, o domínio metalopeptidase geralmente é instável e nunca foi isolado intacto. A Botropasina, Acuragina e Jararagina pertencem a esta subclasse. A subclasse PIIIb engloba toxinas diméricas que não possuem os domínios processados como a VAP1 e HV1 (MASUDA *et al.*, 1998, 2001)

As SVMPs não hemorrágicas também foram descritas em peçonhas de serpentes (DATTA *et al.*, 1995. TERADA *et al.*, 1999, SILVA *et al.*, 2003). Estas enzimas possuem atividade fibrinogenolítica e fibrinolítica direta, independente da ativação do plasminogênio. Além disso, clivam a cadeia α do fibrinogênio mais rapidamente do que a cadeia β (SIGUR *et al.* 1998, RAMOS *et al.*, 2003).

A maioria das SVMPs não hemorrágicas pertence à classe PI, entretanto enzimas como a Ecarina e a Berythactivase são SVMPs não hemorrágicas que pertencem à classe PIII.

Foi demonstrado que as enzimas que apresentam baixa atividade hemorrágica, tais como a BaP1 e a Mutalisina II isoladas de *Bothrops asper* e *Lachesis muta*, respectivamente, possuem maior atividade sobre proteínas da matriz extracelular, quando comparadas àquelas enzimas com alta atividade hemorrágica como a BaH4 (RUCAVADO *et al.*, 1995; 1999; FRANCESCHI *et al.*, 2000). Deste modo, o efeito hemorrágico é provavelmente, consequência da hidrólise seletiva de ligações peptídicas chave de proteínas da matriz extracelular, sem necessariamente induzir a degradação de seus componentes (FRANCESCHI *et al.*, 2000).

Vários estudos relacionados ao potencial hemorrágico das SVMPs foram realizados. A atividade hemorrágica pode estar associada não somente a estrutura da enzima, mas também a modificações pós-traducionais, como o padrão de glicosilação (HITE *et al.*, 1994, GARCIA *et al.*, 2004). Ramos e Selistre-de-Araujo (2004) relataram que características estruturais permitem uma diferenciação entre as SVMPs hemorrágicas e não hemorrágicas da classe PI. Os autores demonstraram que SVMPs não hemorrágicas possuem uma superfície polar maior do que as hemorrágicas.

Garcia *et al.* (2004) demonstraram que a atividade hemorrágica da Jararagina, P-III de *B. jararaca* está relacionada com sítios de glicosilação da proteína, uma vez que a desglicosilação da enzima aboliu seu efeito hemorrágico, mas não interferiu na sua atividade catalítica sobre componentes da MEC.

As SVMPs também hidrolisam proteínas que participam das junções celulares como caderinas e integrinas (WU & HUANG, 2003). Estes autores verificaram que a graminelysina, PI de *Trimeresurus gramineus* teve atividade sobre componentes da MEC e

sobre proteínas que fazem junções aderentes célula-célula (caderinas e cateninas), resultando em apoptose.

Além disso, Saraiva-Otten *et al.* (2004) demonstraram que as SVMPs possuem atividade sobre MMPs endógenas, tanto na ativação do zimogênio, quanto na degradação da enzima ativa.

Outros estudos demonstraram que as SVMPs induzem apoptose em células endoteliais (TORII *et al.* 1997; MASUDA *et al.*, 2001; ARAKI *et al.*, 2002). A VAP1, P III de *Crotalus atrox*, causou apoptose em células endoteliais, porém sem inibir a adesão das células ao colágeno (ARAKI *et al.*, 2002). Desta maneira, foi sugerido que a VAP1 poderia atuar sobre as células endoteliais, clivando proteínas ancoradas à membrana celular, promovendo assim a apoptose.

Respostas celulares mediadas pelas MMPs como alterações em receptores, geração de inibidores da angiogênese e processamento de TNF- α (fator de necrose tumoral), também foram atribuídas as SVMPs (MOURA DA SILVA *et al.*, 1996, HO *et al.*, 2002).

1.4 Matriz Extracelular (MEC)

Os tecidos são formados por células e pelo espaço extracelular, constituído por uma rede de macromoléculas, a matriz extracelular (MEC), que em alguns tecidos está organizada como uma membrana basal (MB) que circunda as células epiteliais, endoteliais e do músculo liso. As células crescem, migram e diferenciam-se em contato íntimo com a MEC (YURCHENCO & O'REAR, 1994).

A MEC é constituída por proteínas fibrosas estruturais como colágeno e elastina, glicoproteínas adesivas como fibronectina e laminina e por proteoglicanas. Nos tecidos conectivos as moléculas de proteoglicanas formam um gel altamente hidratado, embebendo as proteínas fibrosas. Este gel é resistente às forças compressivas e permite a difusão de metabólitos, nutrientes e hormônios entre o sangue e os tecidos.

Além de prover função estrutural aos tecidos moles e rigidez aos tecidos esqueléticos, a MEC serve de substrato no qual as células podem aderir, migrar e proliferar, influenciando diretamente no crescimento, forma e sobrevivência das células epiteliais. A MEC também serve de reservatório para uma variedade de moléculas biologicamente ativas (BOUDREAU & BISSEL, 1998). Os fatores de crescimento são armazenados na MEC através da ligação à HSPGs (*heparan sulfate proteoglicans*) (IOZZO & SAN ANTONIO, 2001).

O fator de crescimento para fibroblastos básico - 2, FGF-2 (fibroblast growth factor) e o fator de crescimento endotelial vascular VEGF (vascular endothelial growth factor) são exemplos de fatores ligados a matriz. A mobilização destes fatores é um mecanismo importante para indução da angiogênese.

As interações entre célula-célula e célula-MEC suprem as células com informações essenciais para homeostase e para o controle da morfogênese, funções tecido-específicas, migração celular, reparo de tecidos, tumorigênese e morte celular. A maioria das células epiteliais requer adesão à MEC para sobreviverem. A perda do contato com a MEC resulta em apoptose, sendo este fenômeno denominado anoikis (FRISCH & SCREATON, 2001). A indução de anoikis ocorre em processos fisiológicos, como a cavitação durante o desenvolvimento de vertebrados e na regressão das glândulas mamárias após a lactação (WEISSEN & WERB, 2000).

Os efeitos da MEC sobre as células são mediados principalmente por receptores de superfície celular denominados de integrinas, os quais desencadeiam diferentes respostas celulares (GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999). As integrinas são formadas por diferentes subunidades α e β , formando várias combinações de integrinas que se ligam a componentes específicos da MEC. Durante a transdução de sinais, as integrinas ativam em paralelo muitos efetores que geram um sistema complexo de integração de sinais. Enquanto que a porção extracelular da maioria das integrinas liga-se a regiões específicas de proteínas da MEC, a porção intracelular é frequentemente ligada ao citoesqueleto através de várias proteínas estruturais e sinalizadoras como talina, vinculina e paxilina, que participam de um grande complexo conhecido como adesão focal (GIANCOTTI, 2000).

A proteólise da matriz extracelular também é de vital importância para uma série de processos que ocorrem durante o remodelamento de tecidos em condições normais e patológicas. Além disso, os fragmentos bioativos liberados pela proteólise limitada da MEC regulam diversas funções celulares (DAVIS *et al.*, 2000). Estes eventos são mediados por proteases e proteínas de adesão de superfície celular (WERB, 1997, STRUELI, 1999). Dentre as enzimas responsáveis pelo remodelamento da MEC estão as MMPs, a proteína morfogênica óssea (BMP1), serinoproteases, peptidases de membranas adamalinas- relacionadas de mamíferos que possuem domínios desintegrina e metalopeptidase (ADAMs) e as ADAMTs que possuem um motivo adicional tipo trombospondina (CHANG & WERB, 2001).

1.5 Constituição da MEC

1.5.1 Colágenos

Os colágenos são os componentes estruturais mais abundantes da MEC. Estas proteínas são homo ou heterotriméricas, cujas subunidades, as cadeias α , são produtos de genes distintos (VAN DER REST & GARRONE, 1991). As seqüências das várias cadeias apresentam um número de motivos repetitivos clássicos Gly-X-Y que formam os domínios COL (*collagenous*) e NC (*noncollagenous*) de diferentes comprimentos e localizações. As porções COL das cadeias formam uma hélice trifilamentar que constitui a característica estrutural dos colágenos (BROWN & TIMPL, 1995).

A molécula de colágeno (tropocolágeno) é longa, rígida e possui uma estrutura tripla hélice, na qual três cadeias polipeptídicas de colágeno se torcem como uma corda helicoidal. Os colágenos são extremamente ricos em glicina e prolina. A glicina geralmente ocupa o terceiro resíduo, pois possui uma cadeia pequena suficiente para ficar no centro da estrutura, sem distorcê-la. Aproximadamente 20-22% dos resíduos na repetição [Gly-X-Y] $_n$ são, respectivamente os iminoácidos prolina (X) e hidroxoprolina (Y). O grupamento hidroxila da hidroxiprolina é essencial para a formação de pontes de hidrogênio que estabilizam a tripla hélice. Resíduos de hidroxilisina também são potenciais sítios de glicosilação. A proporção hidroxilisina/lisina bem como o grau de glicosilação da hidroxilisina varia para diferentes tipos de colágenos e para os mesmos colágenos em diferentes tecidos. Os domínios tripla hélice também variam no comprimento para diferentes colágenos e podem também ser contínuos ou interrompidos por domínios não helicais (NIMNI E HARKNESS, 1988, *apud* FRIES, 1998).

Os colágenos formam polímeros altamente organizados que podem ser agrupados em duas classes principais, colágenos fibrilares e não-fibrilares. A principal diferença entre estas duas classes é que as moléculas dos colágenos fibrilares são constituídas por um único domínio COL, enquanto que as moléculas dos colágenos não-fibrilares apresentam um ou vários domínios COL e NC de tamanhos variáveis.

A maioria dos colágenos apresenta distribuição específica (BROWN & TIMPL, 1995). Os colágenos fibrilares e colágeno VI são encontrados nos tecidos conectivos e intersticiais. O componente estrutural mais abundante da membrana basal é o colágeno IV (Tabela 3). A molécula possui o domínio NC C-terminal e o domínio tripla-hélice relativamente longo (400 nm) com pequenas e várias interrupções que proporcionam flexibilidade à molécula.

Tabela 3. Principais tipos e distribuição de colágenos. Adaptado de FRIES (1998).

Tipo	Característica	Distribuição
I	Feixes e fibras em bandas, alta força elástica	Pele (80%), ossos (90%), tendões
II	Fibras delgadas, proteína estrutural	Cartilagem (50%), humor vítreo
III	Fibras delgadas e elásticas	Pele (10%), útero, vasos sanguíneos
IV	Amorfo	Membrana basal
V	Amorfo, fibrilas finas	Córnea, membrana placentária, interstício, vasos sanguíneos
VI	Amorfo, fibras finas	Interstício
VII	Filamentos de ancoragem	Pele, placenta, pulmões, córnea
VIII	?	Produzido por células endoteliais

O colágeno VII é um homotrímero e sua tripla-hélice é a mais longa (450 nm) descrita para os colágenos de vertebrados (BURGESON, 1993). Associado às estruturas especializadas da MEC, sustenta o epitélio estratificado e ancora fibrilas.

Os colágenos XV e XVIII são denominados multiplexins (*multiple triple-helix domain and interruptions*) e apresentam um domínio central COL flanqueado por regiões NC relativamente grandes (OH *et al.*, 1994).

1.5.2 Fibronectina

A fibronectina (Fn) é uma glicoproteína heterodimérica (400 kDa) com múltiplos domínios, encontrada na matriz extracelular, plasma e outros fluidos corpóreos. Interage com uma variedade de moléculas tais como fatores da coagulação, proteínas de fase aguda e do sistema complemento e vários receptores de superfície celular. As duas subunidades são ligadas covalentemente por pontes dissulfeto próximo a região c-terminal. Cada subunidade é composta por uma série de domínios estruturalmente independentes, ligados por segmentos polipeptídicos flexíveis (POTTIS & CAMPBELL, 1994) (Figura 2).

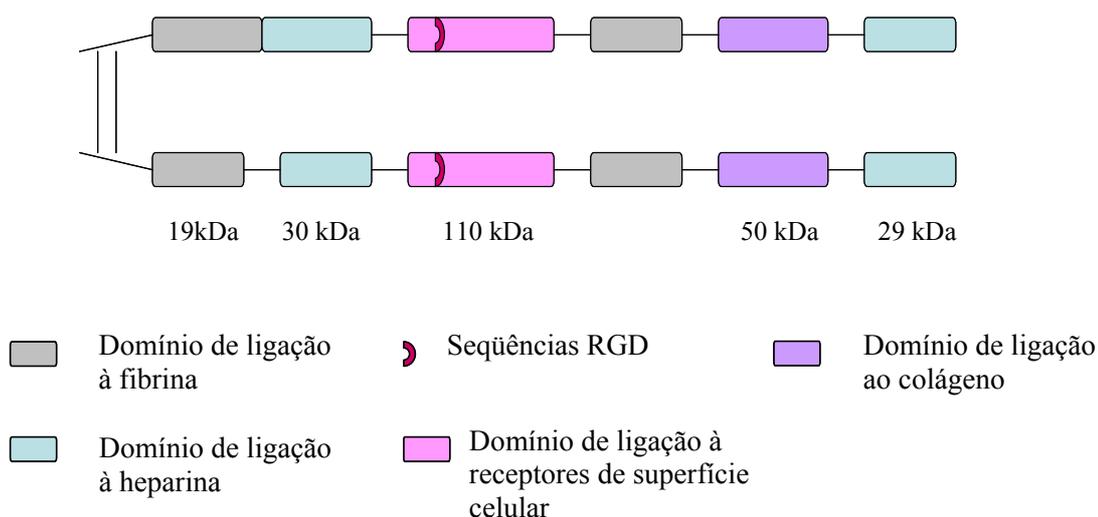


Figura 2. Representação da estrutura dos domínios da fibronectina. A fibronectina nativa é composta de duas subunidades ligadas por pontes dissulfeto próximo à região C-terminal de cada subunidade. Adaptado de AUMAILLEY & GAYRAUD, 1998.

A seqüência de aminoácidos da fibronectina revelou três tipos de repetições ou módulos internos separados por seqüências conectoras pequenas. Existem doze módulos do tipo I, dois do tipo II e quinze do tipo III, também referidos como Fn1, Fn2 e Fn3. Cada módulo constitui uma unidade independente, podendo ser isolado por digestão enzimática ou expresso na forma recombinante. A análise tridimensional demonstrou que os três tipos

de módulos são constituídos exclusivamente por folhas betas antiparalelas e poucas ou nenhuma alfa hélice (PLAXCO *et al.*, 1996).

A digestão da fibronectina por proteases gera fragmentos ativos, uma vez que estes possuem habilidade de interagir com outras macromoléculas. Quando termolisina é utilizada, são obtidos os fragmentos: N-terminal de 29 kDa que liga à heparina, fragmento de ligação à gelatina de 42-50 kDa, fragmento de ligação à célula de 110 kDa, fragmento com alta afinidade à heparina de 30-40 kDa e o fragmento C-terminal que liga à fibrina. O domínio central de ligação às células contém a sequência consenso RGD (Arg-Gly-Asp), o qual é reconhecido por algumas integrinas. Os fragmentos proteolíticos específicos da fibronectina, incluindo o N-terminal-29 kDa, ligação à gelatina- 50 kDa e de ligação a célula-110 kDa, regulam a expressão de MMPs. O aumento da atividade das MMPs mediado por estes fragmentos, causa por exemplo, condrólise da cartilagem (BEWSEY *et al.*, 1996).

1.5.3 Trombospondinas (TSPs)

As TSPs são uma família de proteínas homólogas que possui cinco membros bem caracterizados TSP-1,-2,-3,-4,-5, codificados por genes distintos. Cada um destes cinco membros possui um padrão de expressão específico em tecidos adultos e embrionários e a maioria dos tecidos expressa pelo menos um tipo de TSP (LAWLER, 2000).

As TSP-1 e 2 são estruturalmente semelhantes e diferem na expressão durante o desenvolvimento. As TSPs -3,-4 e -5 também são estruturalmente semelhantes e diferem das TSPs 1 e 2 na distribuição e quantidade de domínios. Dentre estas, a TSP-1 é a mais

estudada, particularmente sua função na ativação do TGF- β , angiogênese e tumorigênese (LAWLER, 2000).

A TSP-1 é uma glicoproteína modular composta de múltiplos domínios ativos que modulam respostas celulares através de ligações a receptores, componentes da MEC, enzimas proteolíticas e fatores solúveis (CHEN *et al.*, 2000, BORNSTEIN, 2001). A TSP-1 solúvel é o produto de secreção mais abundante dos grânulos α das plaquetas, sendo rapidamente secretada em sítios de injúria, inflamação e trombose (REED *et al.*, 1995). A TSP-1 também é sintetizada e secretada por diversos tipos celulares incluindo fibroblastos, células endoteliais e de músculo liso e está relacionada com a migração e proliferação das células durante o desenvolvimento, cicatrização, angiogênese e tumorigênese.

A TSP-1 é um trímero constituído de três cadeias idênticas de 140 kDa unidos por ligação dissulfeto próximo a extremidade N-terminal. Cada cadeia possui um domínio globular N-terminal responsável pela ligação à heparina e a superfície celular por intermédio da ligação a HSPG, um domínio de homologia ao procolágeno, que contém a seqüência CSVTCG responsável pela ligação ao CD36 das plaquetas e três tipos de motivos repetidos designados tipo I, tipo 2 e tipo 3 (Figura 3).

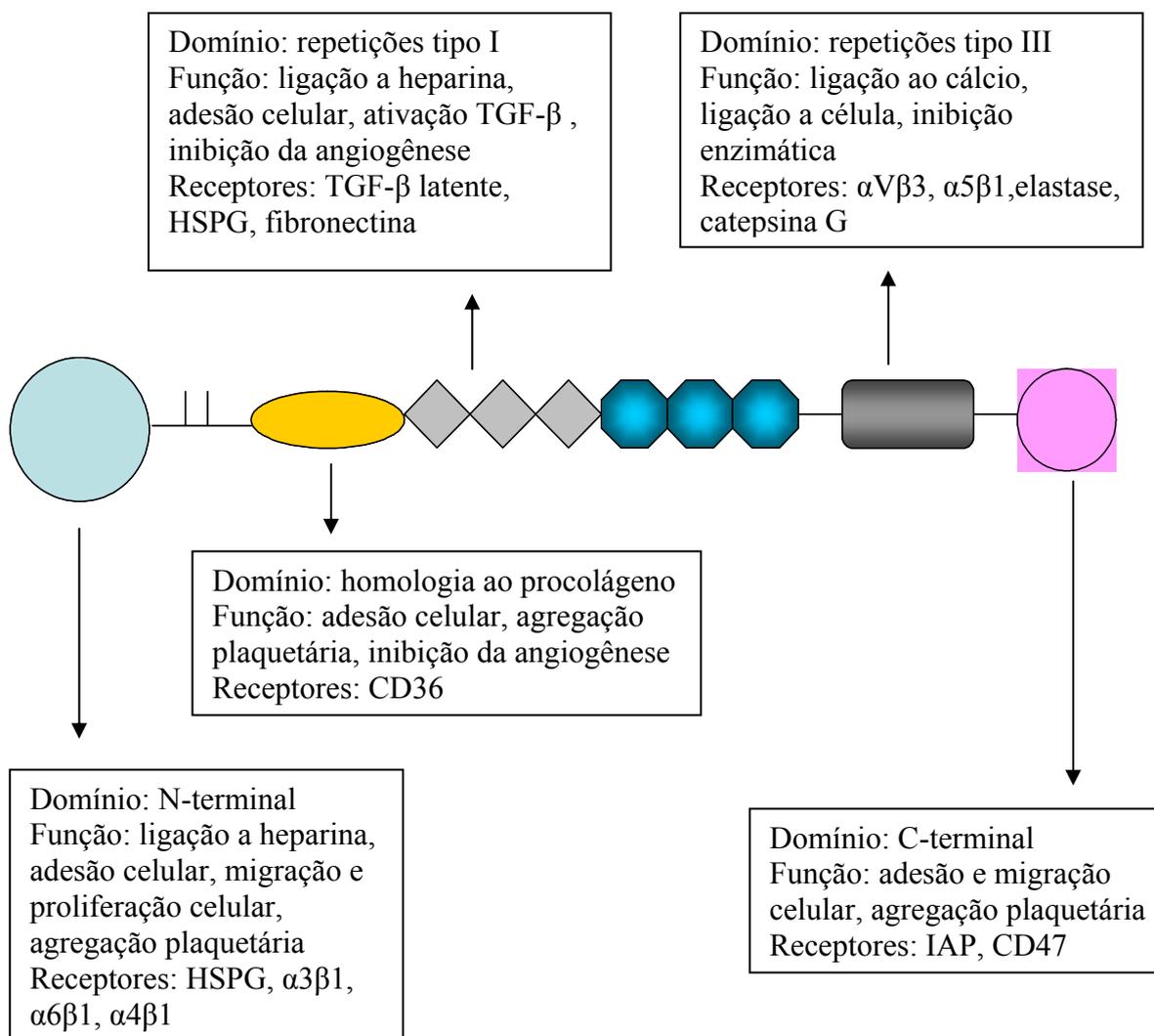


Figura 3. Representação esquemática da estrutura modular e funções da TSP-1. (Adaptado de LAWLER, 2000).

A TSP-1 foi o primeiro inibidor endógeno da angiogênese identificado (TARABOLETTI *et al.*, 1990), embora sua função na angiogênese seja complexa devido à presença de domínios com atividades pró - e antiangiogênicas na molécula.

A atividade anti-angiogênica foi localizada no fragmento de 140 kDa da TSP (repetições tipo I na Figura 3), que também apresenta atividade antineoplásica (CASTLE *et al.*, 1997, TARABOLETTI *et al.*, 2000). Através desse fragmento, a TSP liga-se com alta afinidade com o FGF-2. (TARABOLETTI *et al.*, 1997). O FGF-2 é um fator

angiogênico que é armazenado na MEC através da ligação com HSPGs. A mobilização desse fator é um importante mecanismo para a indução da angiogênese. O FGF-2 ativo é liberado por heparina, MMPs, heparanases e proteínas ligantes de FGF-2.

Diferentes mecanismos contribuem para a atividade antiangiogênica da TSP-1. A interação das seqüências do domínio tipo I da TSP-1 com CD 36 conduz a ativação da cascata Fyn-caspase-3-p38 MAPK, que é considerado o maior mecanismo de inibição da motilidade das células endoteliais e indução de apoptose.

Margosio *et al.* (2003), demonstraram que a TSP-1 inibe a associação do FGF-2 com a matriz e mobiliza o FGF-2 associados à MEC.

Além do FGF-2, a TSP-1 liga-se ao VEGF e HGF, inibindo suas atividades proangiogênicas (GUPTA *et al.*, 1999). Desse modo, a modulação da interação de fatores angiogênicos com a MEC e suas disponibilidades é um mecanismo que contribui para a atividade antiangiogênica da TSP-1.

1.5.4 Lamininas

As lamininas são umas famílias de glicoproteínas localizadas tipicamente na membrana basal (MB) que junto com colágeno IV, nidogenio/entactina e proteoglicanas, contribuem com a formação supramolecular da MB. Além disso, possuem funções essenciais na diferenciação celular, movimento e forma das células e manutenção do fenótipo tecidual (COLOGNATO & YURCHENCO, 2000). Estas proteínas são macromoléculas constituídas pela associação de três polipéptidos geneticamente distintos, as cadeias α , β , e γ . Foram clonadas e seqüenciadas cinco cadeias α ($\alpha 1 - \alpha 5$), três cadeias β ($\beta 1 - \beta 3$) e duas cadeias γ ($\gamma 1 - \gamma 2$) (AUMAILLEY & KRIEG, 1996). O N-terminal de

cada cadeia apresenta regiões pobres em cisteínas que formam domínios globulares e repetições tipo EGF. A região longa da molécula é formada pela região C-terminal de cada cadeia, cujas seqüências são constituídas por motivos que permitem a formação de uma super hélice (TIMPL & BROWN, 1996) (Figura 4).

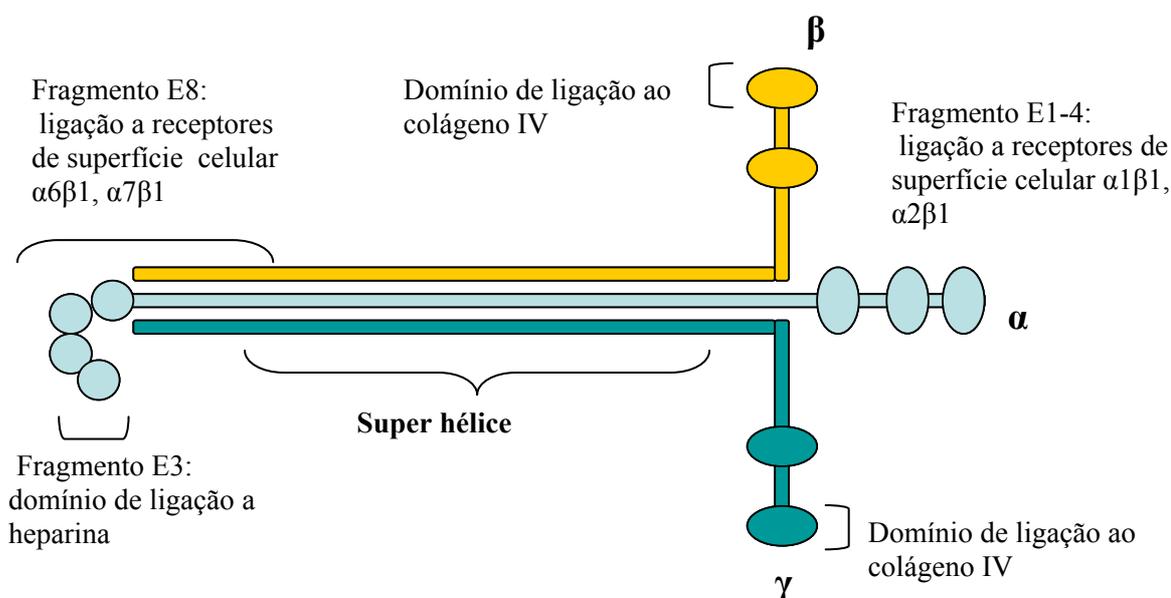


Figura 4. Representação esquemática da estrutura da laminina-1 e seus domínios de ligação. Adaptado de AUMAILLEY & GAYRAUD, 1998.

Existem mais de doze isoformas de lamininas (PATARROYO *et al.*, 2002) e dentre estas, a mais estudada é a laminina-1, que foi isolada do tumor Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) transplantado para camundongo (TIMPL & BROWN, 1996), sendo frequentemente referida como laminina EHS.

A laminina-1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$) é expressa majoritariamente durante a embriogênese, sendo essencial para formação e organização da MB. A laminina -1 também é importante durante a diferenciação e organogênese, já que foi demonstrado que esta proteína é requerida para a formação dos pulmões, rins e intestinos, bem como para a migração da

crista neural e maturação das células ganglionares (De ARCANGELIS *et al.*, 1996, LI *et al.*, 2003).

1.5.6 Proteoglicanas

As proteoglicanas são uma família de moléculas caracterizadas por apresentarem uma proteína central ligada a uma ou mais glicosaminoglicanas (GAGs). As GAGs apresentam uma cadeia longa composta por unidades dissacarídicas repetidas. As unidades dissacarídicas geralmente contêm hexosamina e ácido urônico (glicuronato ou iduronato), e estes açúcares são frequentemente sulfatados.

As GAGs são fortemente hidrofílicas e tendem a assumir conformações estendidas que ocupam grande volume em relação à sua massa. Formam géis que variam quanto ao tamanho do poro e regulam a passagem de moléculas através do meio extracelular. Também podem ligar fatores de crescimento e outras moléculas que servem de sinais para as células (IOZZO & MURDOCH, 1996).

As proteoglicanas são encontradas no fluido sinovial, humor vítreo, parede das artérias, medula e cartilagem. Elas são os componentes majoritários MEC, onde interagem com proteínas como colágeno, elastina, fibronectina e laminina.

Os estudos na área da glicobiologia revelaram que as GAGs estão envolvidas ou influenciam eventos biológicos. Existem quatro famílias de GAGs estruturalmente distintas: heparan sulfato/heparina, condroitin sulfato/dermatan sulfato, queratan sulfato e ácido hialurônico (TAYLOR E GALLO, 2006).

O heparan sulfato induz a síntese de citocinas e auxilia na função de fatores de crescimento, modifica funções enzimáticas como antitrombina III, interage com citocinas e quimiocinas e participa da ligação e recrutamento de leucócitos. Condroitin/dermatan sulfato induzem a expressão de ICAM-1 e recrutam leucócitos através da interação com

selectinas. O ácido hialurônico (AH) também está envolvido no recrutamento de leucócitos através da interação com CD44. O AH é uma macromolécula que consiste de repetidas unidades dissacarídicas Gla-Nac e GlcA e juntamente com outras GAGs mantém a estabilidade estrutural da MEC (FRASER *et al.*, 1997).

Durante a inflamação ou após injúria o AH é degradado em fragmentos de baixa massa molecular. A degradação pode ocorrer enzimaticamente por hialuronidas ou mecanicamente e tem implicação direta no reparo tecidual e eventos inflamatórios. Os fragmentos do AH de baixa massa molecular participam de uma variedade de eventos de sinalização celular, como proliferação, migração, diferenciação, angiogênese e indução de citocinas (TAYLOR E GALLO, 2006).

1.6. Citocinas

As citocinas são proteínas solúveis de baixa massa molecular que atuam como mediadores nas interações celulares em eventos imunológicos e inflamatórios. A maioria das citocinas é produzida por diferentes tipos celulares e possuem amplo espectro de ação (BORISH e STEINKE, 2003).

As citocinas ativam o endotélio, pois induzem a síntese de moléculas de adesão e mediadores químicos como quimiocinas, fatores de crescimento, eicosanóides, óxido nítrico e MMPs. (BALEVICQUA, 1993, KUSANO *et al.*, 1998).

Embora muitas citocinas possuam várias funções, pode-se agrupá-las em cinco classes de acordo com sua função principal ou a natureza da célula - alvo (ABBAS, 1997).

- Citocinas que medeiam a imunidade natural: IL-1 β , interferons, TNF- α e IL-6.

- Citocinas que regulam o crescimento e diferenciação dos linfócitos: IL-2, -4, -5, -10, -12 e TGF- β .
- Citocinas que ativam células inflamatórias: interferon- γ , TNF- α , linfotóxina, IL-5, -10 e 12.
- Quimiocinas: IL-8, GRO (*growth regulated oncogene*, MGSA), MIP-1 (proteína inflamatória de macrófagos-1 α), MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos), -3, RANTES (expressa e regulada por células T normais e reguladas).
- Citocinas que estimulam a hematopoiese: IL-3, -7, GM-CSF, G-CSF.

1.6.1 Quimiocinas

As quimiocinas são uma superfamília de proteínas pequenas que atuam como ativadores e quimioatratadores para tipos específicos de leucócitos (ADAMS & LOYD,1997). Apresentam semelhanças na seqüência de aminoácidos e compartilham padrões de repetições de cisteínas em pares e duas pontes internas de dissulfeto. Medeiam suas atividades através da ligação a receptores nas superfícies das células acoplados a proteína G (PREMACK & SCHALL, 1996).

De acordo com o arranjo dos resíduos de cisteína conservados nas moléculas, as quimiocinas são divididas em quatro classes (ZLOTNIK E YOSHIE,2000):

Quimiocinas C-X-C: possuem um resíduo de aminoácido separando os dois primeiros resíduos de cisteínas conservados. A IL-8 é típica desta classe, sendo secretada por macrófagos, células endoteliais e outros tipos celulares. A IL-8 causa ativação e quimiotaxia de neutrófilos. Seus indutores mais potentes são as citocinas IL-1 e TNF- α (KUNKEL *et al.*,1995).

Quimiocinas C-C: apresentam os dois primeiros resíduos de cisteína adjacentes. Desta família fazem parte a MCP-1 MIP-1 α , RANTES, e geralmente atraem monócitos, linfócitos, basófilos, mas não neutrófilos (TEIXEIRA *et al.*, 1997).

Quimiocinas C: não possuem o primeiro e o terceiro dos quatro resíduos conservados de cisteína. Quimiocinas C como a linfotactina são específicas para linfócitos.

Quimiocinas C-X₃-C: apresentam três aminocidos entre as primeiras duas cisteínas. A fractalcina é ao mesmo tempo uma molécula de adesão e um agente quimiotático que possui atividade sobre monócitos e linfócitos tipo T (ROLLINS, 1997).

As quimoquinas apresentam efeito pleiotrópico na imunidade, regulação da angiogênese e metástases. Este grupo de citocinas também regula a polimerização e despolimerização de actina nos leucócitos para movimentos e migração e funcionam como quimoatraentes. As quimiocinas são produzidas localmente nos tecidos e direcionam a migração de leucócitos. O gradiente tecidual de quimiocinas atrai as células inflamatórias para os sítios de infecção, inflamação e câncer (FOXMAN *et al.*, 1997).

As quimoquinas CXC são proteínas ligantes de heparina que disparam funções na regulação da angiogênese. O N-terminal de várias quimoquinas CXC contém três resíduos de aminoácidos Glu-Leu-Arg, (motivo “ELR”), que imediatamente precedem o primeiro motivo de cisteína. As quimoquinas CXC com motivo ELR (ELR+) promovem angiogênese. Ao contrário, as quimoquinas CXC que são em geral induzíveis por interferon e perderam o motivo ERL (ERL-) inibem a angiogênese (STRIETER *et al.*, 2005, MOORE *et al.*, 1998). A Interleucina -8 (IL-8) pertence a família de CXC com motivo ELR+ e pode ser induzida em várias células, incluindo monócitos, linfócitos, fibroblastos, endoteliais e queratinócitos (ROEBUCK, 1999)

A GRO é uma proteína de 8 kDa que além de estimular a mitogênese em células normais e tumorais, promove quimiotaxia e desgranulação de neutrófilos.

A MCP-1 (monocyte chemoattractant-1) exerce efeito quimiotático sobre monócitos e linfócitos T. Além disso, está envolvida em processos inflamatórios e angioproliferativos em patologias cerebrais e da retina (HARKNESS *et al.*, 2003).

As quimiocinas CXC angiogênicas promovem a angiogênese por mecanismos adicionais via indução da expressão MMPs, tais como MMP-2 e MMP-9, pois a degradação da MEC por estas enzimas facilita a migração de células endoteliais para o estímulo angiogênico (LUCA *et al.*, 1997, INOUE *et al.*, 2000).

Tabela 4. Quimioquinas CXC que regulam a angiogênese (STRIETER *et al.*, 2005).

Quimioquinas angiogênicas ELR+	Quimioquinas angiostáticas ELR-	
IL-8 (CXCL8)	PF-4 (fator plaquetário -4, CXCL4)	
ENA-78 (CXCL5)	MIG (CXCL9)	} induzidas por interferon
GRO- α (CXCL1)	IP-10 (CXCL10)	
GRO- β (CXCL2)	ITAC (CXCL11)	
GRO- γ (CXCL3)	CXCL14	
GCP-2 (CXCL6)		

1.7. Endotélio Vascular

O endotélio vascular é constituído de uma monocamada contínua de células, denominadas células endoteliais (CE), que recobre a luz dos vasos sanguíneos. Forma uma importante barreira seletiva, separando as células do sangue e fatores da coagulação de elementos altamente trombogênicos do subendotélio. O endotélio mantém a fluidez do sangue e regula o tônus vascular, além disso, proporciona a troca de gases e moléculas do meio interno com o meio externo (SCHAFER, 1997, CINES *et al.*, 1998).

As CE são derivadas de precursores mesodermicos pluripotentes, os angioblastos e são caracterizadas por apresentarem nos seus citoplasmas organelas denominadas corpos de Weibel-Palade. Estas organelas armazenam e secretam proteínas como o fator de von Willebrand (fvW) e interleucina-8 (IL-8). As CE exercem funções importantes no controle da hemostasia, angiogênese e processos inflamatórios e imunológicos e no metabolismo de substâncias vasoativas, como na conversão de angiotensina I e angiotensina II, na síntese substâncias vasodilatadoras, prostaciclina (PGI₂) e óxido nítrico (SCHAFER, 1997).

A estimulação das CE resulta, entre outros processos, na liberação dos multímeros grandes de fvW, que permitem a união das plaquetas ao subendotélio e a união plaqueta-plaqueta que culmina com a formação do trombo plaquetário (RUGGERI E WARE, 1993).

Desta maneira, existe um equilíbrio dinâmico entre o fenótipo antiagregante e procoagulante do endotélio vascular. Os coágulos de fibrina, formados em consequência da atividade procoagulante, podem ter uma função protetora do órgão, limitando o dano vascular induzido por trauma. No entanto, a infecção, inflamação e a perda da atividade anticoagulante de maneira repetida ou incontrolada podem predispor à desordens trombóticas.

Os leucócitos são essenciais na resposta inflamatória devido às atividades fagocítica e secretora (ULBRICHT *et al.*, 2003). O movimento dos leucócitos da corrente sanguínea para o local da injúria é crucial na reação inflamatória. O processo envolve captura, rolamento e forte adesão ao endotélio, seguido de transmigração através da parede do vaso e migração até o tecido (MIDDLETON *et al.*, 2002). Todas estas etapas são conduzidas pelas moléculas de adesão celular (CAMs- cell adhesion molecules), tanto dos leucócitos quanto das células endoteliais (KAPLANSKI *et al.*, 2003).

As CE apresentam moléculas de adesão celular (CAMs- cell adhesion molecules) que atuam como moléculas sinalizadoras e têm participação essencial na regulação da inflamação e resposta imune. A expressão de CAMs é regulada por mediadores inflamatórios (KAPLANSKI *et al.*, 2003).

Entre as CAMs o endotélio apresenta selectinas (P e E) e VCAM-1 e ICAM-1 e 2, que são responsáveis pelo recrutamento e migração seletiva de células inflamatórias dos vasos sanguíneos até o local da inflamação (SILVERSTEIN, 1999).

A diminuição na velocidade de rolamento dos leucócitos, promovida pela vasodilatação, favorece o encontro dos leucócitos com autacóides e quimioquinas, como IL-8 e proteína quimiotática de macrófagos (MCP-1), presentes na superfície apical de CE. Estes mediadores ativam outros polimorfonucleares que se unem as moléculas de adesão expressas no endotélio e estabelecem ligações resistentes (BERLIN *et al.*, 1995).

As CE também expressam proteínas regulatórias na superfície celular, como o *decay-accelerating factor* (DAF, CD 55), que protege as CE do efeito deletério da ativação do sistema complemento. O DAF é expresso de maneira constitutiva, porém sua expressão pode ser aumentada pela estimulação com trombina, lipopolissacarídeos e TNF- α (fator de necrose tumoral-alfa) (MIWA & SONG, 2001).

1.8 Apoptose

A homeostasia tecidual é dependente de um balanço entre a proliferação e a morte celular. Um desequilíbrio nesse balanço pode resultar em proliferação ou apoptose indesejadas (VERMEULEN *et al.*, 2003).

As células animais necessitam de sinais provenientes de outras células e da MEC para sobreviverem. Na ausência destes fatores de sobrevivência, as células ativam um programa de suicídio intracelular e morrem por apoptose, um tipo de morte celular programada que é mediada por uma cascata proteolítica intracelular. A apoptose está envolvida em eventos fisiológicos como regressão tecidual, morfogênese, desenvolvimento e involução de órgãos, mas também ocorre em diversos processos patológicos (HAIL *et al.*, 2006).

A apoptose foi classificada como tipo I (clássica) e tipo II (não clássica). A apoptose tipo I é caracterizada pela condensação do citoplasma e da cromatina nuclear, resultando na fragmentação do DNA e na alteração da membrana celular. Esta seqüência é seguida pela fragmentação celular, denominada corpos apoptóticos e posterior fagocitose pelas células adjacentes. Este tipo de apoptose ocorre em células da granulosa, endoteliais e linfócitos (LENARDO *et al.*, 1999, STEFENEC, 2000).

A apoptose tipo II é reconhecida pela condensação e fragmentação nuclear tardias e foi caracterizada na glândula mamária de camundongos. O primeiro sinal morfológico deste tipo de morte celular é a expansão do sistema lisossomal, onde vacúolos autofágicos removem seletivamente organelas específicas e eventualmente consomem todo o citoplasma. A condensação do núcleo seguido de fragmentação ocorre somente após a redução do citoplasma (ZAKERI *et al.*, 1995). Este tipo de apoptose é observada em tecidos que sofrem massiva morte celular e morfogênese.

A maquinaria apoptótica inclui receptores de morte (Fas, TNF), proteínas pró e antiapoptóticas da família Bcl-2, e uma família de proteases, denominadas caspases, que ativam proteínas tóxicas e destroem proteínas essenciais, levando a destruição celular. Na apoptose, as células sofrem condensação e encolhem. O citoesqueleto é destruído, o envelope nuclear é degradado e o DNA fragmentado, levando a formação de vesículas

apoptóticas. A célula é então fagocitada por células vizinhas e pelos macrófagos (KIECHLE & ZHANG, 2002).

A perda do contato das células com a MEC mediado por integrinas resulta na morte de tais células por apoptose, sendo este fenômeno referido como anoikis (MEREDITH *et al.*, 1993, GROSSMAN, 2002). Em HUVECs, anoikis está associada com o sistema Fas/FasL, envolvendo a ativação de caspase-8 (AOUDJIT e VOURI, 2001).

Outro tipo de indução de apoptose mediado por integrinas ocorre durante o remodelamento de tecidos e hemostasia (STUPACK *et al.*, 2001). Este tipo de apoptose denominado IMD (*integrin – mediated death*) é bioquimicamente diferente de anoikis e ocorre quando integrinas não ligadas ou antagonizadas recrutam e ativam a caspase-8 de maneira independente de receptor de morte celular. A superexpressão da integrina $\alpha 5\beta 1$ foi associada com apoptose e redução do crescimento tumoral *in vivo* (KIM *et al.*, 2000).

Stupack *et al.* (2001) demonstraram que a integrina $\alpha v\beta 3$ quando não ligada ou antagonizada (STORGARD *et al.*, 1999) é pró-apoptótica. Entretanto a ligação da integrina à fibronectina rompe o complexo caspase-integrina e aumenta a sobrevivência das células. Estas observações demonstraram que as integrinas influenciam a sobrevivência das células, propondo uma função para estas moléculas como mediadores pró-ativos da morte celular.

1.9 Resultados anteriores

A partir da biblioteca de cDNA feita das glândulas veneníferas da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus* (Broad-banded copperhead), foram isolados e seqüenciados dois clones, ACLPREF (GeneBank U18233) e ACLPREH (GeneBank U18234) que codificam metalopeptidases pequenas contendo três pontes dissulfeto no domínio catalítico (SELISTRE DE ARAUJO E OWNBY, 1995). O clone ACLPREF codifica a proteína ACLF e o clone ACLPREH codifica a toxina hemorrágica I, ACLH-I.

A ACLF e a ACLH possuem 98% de identidade, compartilhando 77,85% de pareamentos idênticos e 84,18% de pareamentos similares.

Em nosso laboratório, foi desenvolvido um sistema de expressão em bactéria para produção recombinante da ACLF (rACLF) e ACLH (rACLH). A rACLF possui atividades fibrino e fibrinogenolítica associadas à ausência de homorragia (SELISTRE-DE-ARAUJO *et al.*, 2000). Dentre os substratos sintéticos estudados, foi demonstrado que a rACLF hidrolisa o peptídeo central da cadeia β da insulina e que hidrolisa fracamente a bradicinina (RAMOS, 2003).

A ACLH nativa é uma metalopeptidase hemorrágica (dose hemorrágica mínima de 8,5 μ g) que possui atividade sobre fibrinogênio e dimetilcaseína (Johnson e Ownby, 1993). Entretanto a sua forma recombinante não apresentou atividade hemorrágica, provavelmente devido à ausência de N-glicosilação presente entre os resíduos 367 – 370 (NCSY). Os sítios de N-glicosilação presentes na maioria das metaloproteases hemorrágicas supostamente estão relacionados com o efeito hemorrágicos destas proteínas. Garcia *et al.* (2004) demonstraram que a glicosilação é importante para a atividade hemorrágica, mas não interfere na atividade catalítica da enzima, uma vez que o tratamento

da ACLH nativa com PNGgase F aboliu o potencial hemorrágico da enzima, mas não alterou a atividade proteolítica da enzima sobre fibrinogênio e fibronectina.

2. Objetivos

Objetivo geral: estudar o efeito da rACLF na viabilidade celular bem como sua atividade proteolítica sobre componentes da MEC, e substratos sintéticos fluorogênicos.

Objetivos específicos:

- Analisar o efeito da rACLF sobre respostas funcionais do endotélio, enfatizando a produção de moléculas envolvidas na modulação da função plaquetária (óxido nítrico, prostaciclina), na atividade inflamatória (IL-8) e na expressão de moléculas de adesão celular em células endoteliais.
- Estudar o efeito da rACLF na viabilidade e morfologia de células tumorais e não tumorais
- Analisar a secreção de MMPs e citocinas no sobrenadantes de células tratadas com rACLF.
- Realizar um estudo comparativo entre as enzimas rACLH e rACLF, considerando os seguintes aspectos: degradação da proinsulina e do peptídeo fluorogênico correspondente a cadeia β da insulina, viabilidade de células tumorais e não-tumorais.

3. Materiais e Métodos

3.1 Expressão da ACLF recombinante (rACLF) (Ramos et al, 2003)

Culturas de *E.coli* transformadas com o vetor pET28a contendo o inserto ACLPREF foram crescidas a 37°C até atingir o início da fase log de crescimento ($DO_{660} = 0,4 - 0,6$). Atingido este valor, a expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG (Sigma) na concentração final de 0,5 mM. O tempo de expressão foi de 3h a 37°C. Em seguida a cultura foi centrifugada a 5000g a 4°C, por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em tampão de ligação 1x (Imidazol 5mM; NaCl 0,5M; Tris-HCl 20 mM pH 7,9) contendo lisozima 1mg/ml, incubado em banho de gelo durante 1h e sonicado. A suspensão foi posteriormente centrifugada a 13000g a 4°C, durante 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em tampão de ligação acrescido de uréia 6M (Promega) e incubado a 4°C por 1h. O sobrenadante foi cuidadosamente separado e armazenado a -20 °C. Todas as etapas do processo foram analisadas por SDS-PAGE.

A rACLH utilizada em alguns experimentos, foi cedida pelo estudante Lucas T. Parreiras e Silva. O protocolo para a obtenção da enzima está descrito em Garcia *et al* (2004).

3.2 Purificação da rACLF

A fração do sobrenadante com uréia do item anterior foi centrifugada, filtrada e submetida à purificação em coluna Ni-NTA (Níquel-Ácido Nitriloacético, Quiagen) sob fluxo constante de 0,5 ml/min.

A coluna foi previamente equilibrada com 4 volumes de tampão de ligação desnaturante (Imidazol 5mM; NaCl 0,5M; Tris-HCl 20 mM pH 7,9, uréia 6M). Após a aplicação da amostra foi aplicado o tampão de lavagem (Imidazol 20mM; NaCl 0,5M; Tris-HCl 20 mM pH 7,9) para remoção de proteínas ligadas inespecificamente. A proteína recombinante foi eluída com o mesmo tampão acrescido de 1M de imidazol. As frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE.

3.3. Enovelamento in vitro

O enovelamento da proteína foi realizado segundo a metodologia descrita por Itoh *et al.*, (1996) com modificações introduzidas por Selistre-de-Araujo *et al.*, 2000, com a finalidade de remover o agente desnaturante com sucessivas diálises. A solução contendo a proteína foi diluída para o dobro do seu volume em tampão de redução (Tris-HCl 50 mM pH 8,5; DTT 10 mM; uréia 6M) e incubada a temperatura ambiente por 30 min. Em seguida a solução foi diluída cinco vezes com tampão de oxidação (Tris-HCl 50 mM pH 8,5; cisteína 5 mM; cistina 1mM; CaCl₂ 5 mM; ZnCl₂ 100 µM; uréia 6M). A proteína diluída foi dialisada contra o tampão de oxidação contendo quantidades decrescentes de uréia (de 3M; 1,5M; 0,75M; até 0M).

3.4. Determinação da concentração protéica.

A concentração protéica das amostras foi estimada através do método colorimétrico descrito por Bradford (1976), utilizando-se o reagente de Bradford da

BioRad. A concentração das amostras foi determinada através da comparação com a curva padrão de BSA (0,2-1,0 mg/ml), plotada e analisada por regressão linear através do programa Swift II.

3.5 Linhagens celulares utilizadas

HUVECs:	células endoteliais de veia de cordão umbilical humano, aderente
Fibroblastos:	humanos, aderente (Clonetics)
HeLa:	carcinoma de cérvix uterino, tumoral, aderente (ATCC)
MDA-MB-231:	carcinoma mamário, tumoral, aderente, invasiva
MCF-7	carcinoma mamário, tumoral, não-invasiva

3.6 Estudos com HUVECs

Esta parte do trabalho foi realizada no Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan, sob supervisão da Dra Ana Marisa Chudzinski Tavassi.

3.6.1 Cultivo das células

As HUVECs foram obtidas por digestão com colagenase, segundo o método de Jaffe *et al.* (1973). Foram utilizadas células de 1-3 passagens em monocamada confluyente e subconfluyente conforme o tipo de experimento realizado. Inicialmente as células foram cultivadas em garrafas de 25 ou 75cm² com meio completo (RPMI contendo 10% soro fetal bovino (SFB), heparina (45µg/ml), piruvato de sódio (1mM), L-glutamina (2mM),

penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100µg/ml), 2-mercaptoetanol (50µM), fator de crescimento endotelial (EGF) (25µg/ml) e extrato do cérebro de camundongo (0.75%), em estufa a 37C° em atmosfera com 5% de CO₂). Quando confluentes, a monocamada foi tripsinizada e as células foram semeadas em placas de 6, 12 ou 24 poços, conforme o experimento. Para os ensaios algumas modificações no meio foram realizadas.

3.6.2 Ensaio de proliferação celular

O efeito das rACLF na proliferação celular foi estudado em diferentes condições:

- 1) Cultivos subconfluentes (3×10^4 /poço) em placa de 24 poços foram incubados durante 72h com meio RPMI contendo 10% SFB na ausência (controle) ou presença da rACLF para avaliar a ação direta da enzima.
- 2) Cultivos subconfluentes (3×10^4 /poço) em placa de 24 poços foram incubados durante 72h com meio RPMI contendo 10% SFB e EGF (25µg/ml) na ausência (controle) ou presença da rACLF para avaliar possíveis efeitos sinérgicos com outros fatores de crescimento.

Após 72h de incubação, as células foram tratadas com tripsina e a contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer, por microscopia ótica.

3.6.3 Detecção de efeito apoptótico da rACLF em HUVECs

Microscopia de Fluorescência

As alterações morfológicas e a viabilidade celular foram analisadas através da coloração das HUVECs com uma mistura de corantes fluorescentes que se ligam ao DNA, laranja de acridina (100µg/ml) para determinar a porcentagem de células que sofreram apoptose e brometo de etídio (100µg/ml) para diferenciar entre células viáveis e não viáveis.

A indução de apoptose foi avaliada em diferentes condições:

- 1) Cultivos confluentes (2×10^5 células/poço) em placas de 96 poços foram incubados durante 24 ou 48h com meio RPMI contendo 1% SFB na ausência (controle) ou presença da enzima.
- 2) Foram incubadas 2×10^5 células/poço em placas de 96 poços durante 24h com meio RPMI contendo 10% SFB e EGF na ausência (controle) ou presença da rACLF para avaliar a ação da enzima em um microambiente mais próximo do fisiológico.

Em ambas as condições, a presença de células apoptóticas foi avaliada por microscopia de fluorescência, usando as células não aderentes e as aderentes tripsinizadas. Pelo menos 200 células foram analisadas em cada experimento

3.6.4 Detecção de efeito antiapoptótico da rACLF

Para avaliar se a rACLF exerce alguma atividade antiapoptótica, a morte celular foi induzida pela incubação das HUVECs durante 24 ou 48h em meio RPMI contendo 1%

do SFB na presença ou ausência (controle) de rACLF. As células foram analisadas por microscopia de fluorescência como descrito anteriormente.

3.6.5 Expressão de ICAM e DAF

Monocamadas de HUVECs foram incubadas em meio RPMI com rACLF durante 1 hora. Em seguida, o meio foi removido e as células foram incubadas por mais 23h com meio RPMI contendo 10% SFB. Em alguns experimentos as células foram incubadas com a rACLF durante 24h. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS (sem Ca^{2+} e Mg^{2+}), centrifugadas (200 x g, 10 min, 4 °C), ressuspensas em PBS com 10% SFB e incubadas durante 30 minutos com concentrações saturantes de anticorpos monoclonais conjugados com PE anti- CD54 e CD55 (anti- ICAM-1 e anti- DAF) (IgG1) ou com concentrações equivalentes do anticorpo monoclonal irrelevante para determinar a união inespecífica. Após a marcação, as células foram fixadas com paraformaldeído (1%) e analisadas por citometria de fluxo.

3.6.6 Liberação de Prostaglandina I₂ (PGI₂)

A PGI₂ liberada é rapidamente (não enzimaticamente) hidratada para 6-keto-PGF_{1 α} . A liberação de PGI₂ foi medida pelo acúmulo do metabólito 6-keto-PGF_{1 α} no meio de cultura (RPMI 1640). Após 1h de tratamento das HUVECs sem (controle negativo) ou com ACLF em diferentes concentrações, o sobrenadante foi centrifugado durante 10 min, 400 g à 4°C. A concentração do 6-keto-PGF_{1 α} foi medida pelo método de ELISA

competitivo, utilizando o EIA kit 6-keto-Prostaglandin F_{1α} (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA).

3.6.7 Liberação de IL-8

Os níveis de IL-8 foram determinados por ELISA (Oncogene Research Products) nos sobrenadantes das HUVECs controles e tratadas com rACLF por 1h. Após a incubação, as células foram lavadas e meio fresco foi adicionado. A síntese de IL-8 foi determinada após 24 h e os níveis de IL-8 são expressos em pg/ml.

3.7 Estudos com HeLa, fibroblastos humanos e MDA-MB-231 e MCF-7)

As células HeLa, fibroblastos humanos e MDAMB-231 foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Minimum Medium), contendo 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina e 10 mL da solução penicilina-estreptomicina, em uma incubadora de CO₂ a 37 °C. As células MCF-7 foram cultivadas em meio DMEM F12 acrescido de 10 % de SFB e HEPES 2mM.

3.7.1 Ensaio de viabilidade celular

Para o ensaio de viabilidade celular, as células foram adicionadas (2×10^4 células) em DMEM sem soro contendo albumina sérica bovina 2mg/ml - 200mL/poço) em

placa de 96 poços e incubadas por 2h a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Em seguida, diferentes concentrações de rACLF foram adicionadas e as células foram novamente incubadas por 24 ou 48h. As células incubadas sem a enzima foram utilizadas como controle. Decorrido cada tempo, o meio de cultura foi aspirado e foram adicionados 50µL/poço de solução de MTT (0,5mg/mL) [3-(4,5-dimetil) tiazol-2-il 2,5-difenil brometo de tetrazólio] (SIGMA). Após 4 horas de incubação a 37°C em estufa com 5% de CO₂ o precipitado formado foi solubilizado com isopropanol e a absorbância foi determinada em leitor MRX Dynex (595 nm e filtro de 690 nm).

A análise morfológica das células foi realizada em microscópio invertido (Olympus), e as imagens capturadas pela câmera (CoolSnap-Pro Color).

3.7.2 Zimografia

Para detectar e caracterizar peptidases secretadas pelas células, gelatina foi utilizada como substrato nos géis de zimografia. Vinte µg de proteína total de cada meio condicionado foram misturados com tampão de amostra 5X e aplicados em gel SDS-PAGE 10%, copolimerizado com gelatina 2mg/mL. Após a eletroforese a 4 °C, o gel foi incubado em 2,5% de Triton X-100 por 30 min e em seguida o gel foi incubado em tampão de incubação (Tris-HCl 50 mM pH 8,0/CaCl₂ 5 mM/ 0,02% de NaN₃). Após esta etapa, o gel foi corado com Coomassie R-250 e descorado com 10% de ácido acético/40% de metanol, até a visualização das bandas de degradação da gelatina.

3.7.3 Western blot para análise de MMPs

Para identificação de MMP-2 secretada no meio de cultura, trinta microlitros da cada meio condicionado foram aplicados em SDS-PAGE 15%. Após a eletroforese, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após o bloqueio com BSA 1%, as membranas foram incubadas por 2 h com anticorpos primários anti-MMP-2 (Triple Point Biologics, Inc.) na diluição de 1:1000. Após as lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (1:5000) conjugado a fosfatase alcalina, e para o desenvolvimento da coloração foi utilizado o kit AP conjugate Substrate (Bio Rad, Hercules CA).

3.7.4 Expressão de citocinas

A detecção de citocinas nos meios condicionados de fibroblastos humanos incubados sem rACLF (controle) e com rACLF 120 nM foi realizada utilizando-se o kit Ray Bio Human Cytokine antibody array, (Ray Biotech, Inc.) seguindo especificações do fabricante. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com 1 mL de meio condicionado. Em seguida foram lavadas para remoção do material não ligado e incubadas com anticorpo biotilado contra diferentes citocinas. As membranas foram lavadas novamente e incubadas com estreptavidina conjugada a peroxidase por 2 h a temperatura ambiente. Após a lavagem, os sinais foram detectados pela exposição da membrana ao filme de raios-X (ECL hyperfilm, Amersham) por 40 segundos.

3.7.5 Atividade proteolítica da rACLF sobre componentes da matriz extracelular.

Laminina, trombospondina, fibronectina(Gibco BBR), e colágeno IV (Sigma) foram incubados com a enzima na proporção 20:1 (substrato: enzima) em tampão Tris-HCl 50 mM/ NaCl 10 mM/CaCl₂ 2mM, pH 8,0. Os substratos incubados sem a enzima foram utilizados como controle. Após a incubação por 1 h, 6 h e 24 h a 37 °C, alíquotas foram retiradas, adicionadas ao tampão de amostra contendo mercaptoetanol e fervidas por três min. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE e as proteínas foram visualizadas através da coloração do gel com azul de Coomassie.

3.7.6 Atividades sobre pró-insulina recombinante porcina

A pró-insulina (Biommm) foi incubada com as enzimas na proporção enzima: substrato (1:10) por 4 horas. O substrato incubado sem a enzima foi utilizado como controle. Após a incubação, as amostras foram adicionadas ao tampão de amostra contendo mercaptoetanol e fervidas por três min. As amostras foram analisadas em gel de Tricina 16% e as proteínas visualizadas com azul de Coomassie.

3.7.7 Atividade proteolítica da rACLF sobre os substratos sintéticos

Os ensaios com peptídeos fluorogênicos foram realizados em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 a 37⁰C. A hidrólise foi monitorada continuamente em fluorímetro Hitachi F-2000 com os comprimentos de ondas de excitação e emissão de 320 nm e 420 nm,

respectivamente. Os parâmetros cinéticos foram calculados por análise da regressão linear da velocidade inicial da hidrólise dos substratos pelo programa Grafit (Erithacus Software, Steines, UK). O desvio padrão dos valores de k_{cat} e K_m foram menores que 5%. Os valores de eficiência catalítica foram calculados como razão resultante de k_{cat}/K_m . Os seguintes peptídeos foram utilizados: Abz-LVEALYQ-EDDnp, Abz-KLAFSKQ-EDDnp, Abz-KLGFSKQ-EDDnp, Abz-KLKFSKQ-EDDnp, Abz-KLRFAKQ-EDDnp. Estes experimentos foram realizados sob orientação da Dra. Adriana Carmona (UNIFESP-EPM)

3.7.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como as médias (\bar{X}) \pm erro padrão (ES) e analisados utilizando-se a análise da variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnett. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. Resultados

4.1 Expressão, purificação e ativação da rACLF

As amostras provenientes do ensaio de expressão e solubilidade foram analisadas por SDS-PAGE 15%.

O ensaio de expressão mostra que a proteína foi produzida na forma insolúvel de corpos de inclusão, mas foi solubilizada pela adição de agentes desnaturantes (Figura 5 A). Após o ensaio de expressão e solubilidade, foi realizada a purificação da proteína em coluna de níquel. Cerca de 50 mL de S2 obtidos a partir de 1 litro de cultura foram filtrados e aplicados em 10 mL de resina de níquel. As frações eluídas com 1M de imidazol foram analisadas por SDS-PAGE 15% estão representadas na figura 5 B. As frações contendo a proteína recombinante em condições de pureza adequada foram utilizadas para os ensaios de atividade.

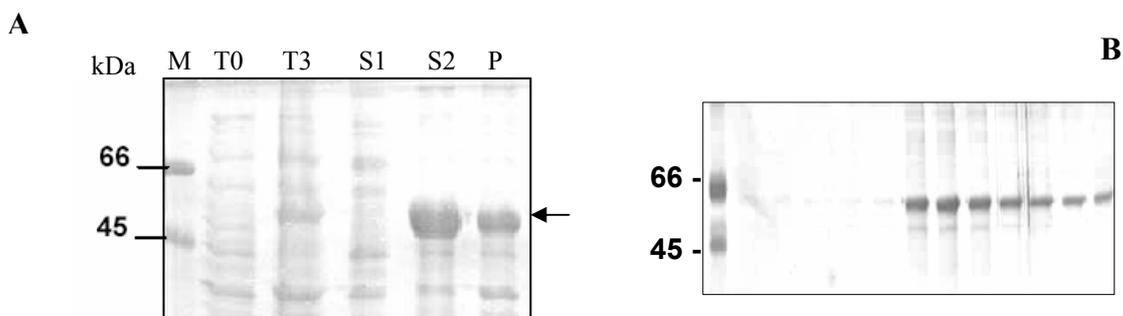


Figura 5 Ensaio de expressão e solubilidade da pró-rACLF em *E.coli* (A). M: marcador de massa molecular T0: extrato celular basal, T3: extrato celular após indução com IPTG, S1: sobrenadante sem uréia, S2: sobrenadante com uréia, P: precipitado solubilizado com uréia. A seta indica a super produção da proteína de 48 kDa. (B): purificação da proteína recombinante em coluna Ni-NTA. As frações apresentadas foram eluídas com 1M de imidazol

A proteína desnaturada foi reduzida em tampão contendo DTT e uréia 6M. Através da remoção gradativa do agente desnaturante, foi possível obter a rACLF na forma ativa. Após esta etapa, a enzima foi concentrada por filtração sob pressão e a concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford (1976). A dosagem protéica após o processamento e concentração foi estimada em 2,5 mg, por litro de cultura. Como demonstrado na figura 6, a rACLF sofre autoprocessamento após a remoção do agente desnaturante, pois observa-se o desaparecimento da banda de 48 kDa e o surgimento de três novas bandas (29, 27 e 23 kDa).

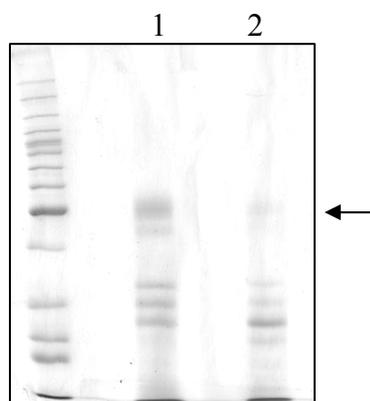


Figura 6 Ativação da pró-rACLF. SDS-PAGE 15%. 1: rACLF após renaturação por diálise e após 1h de incubação a 37°C, canaleta 2.

4.2 Efeito da rACLF sobre a proliferação de células endoteliais

O cultivo de HUVECs assincrônicas em meio suplementado somente com SFB (10%) mantém as mesmas em estado quiescente, ou seja, não há crescimento celular, porém as células se mantêm viáveis por um determinado período de tempo.

Nestas condições, a presença de rACLF (210 nM), nas culturas não mostrou diferença significativa quando comparada com o controle (Tabela 5). Pode-se concluir que a enzima não foi capaz de estimular a proliferação das HUVECs.

Tabela 5. Proliferação de HUVECs em RPMI (10% SFB). HUVECs foram incubadas durante 72h em meio RPMI (10% SFB) com ou sem as rACLF. As células aderidas foram tripsinizadas e a contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer por microscopia óptica. Os valores indicam a média \pm ES de 6 experimentos independentes. Não houve diferença significativa (ANOVA, Dunett).

n° de células x 1000	
Controle	ACLF (210 nM)
26,1 \pm 1,3	28,3 \pm 3,7

4.3 Apoptose induzida por rACLF em células endoteliais

Neste experimento foram avaliadas a presença de núcleos apoptóticos e viabilidade celular através da marcação das células com laranja de acridina e brometo de etídio respectivamente, em distintas condições de cultivo. Quando monocamadas de HUVECs foram mantidas por 24 h em presença de 10% SFB, a rACLF (210nM) não foi capaz de induzir apoptose ou mudanças na viabilidade celular (Tabela 6) .

Tabela 6. Indução de apoptose em HUVECs por rACLF. HUVECs foram incubadas durante 48h em meio RPMI (10% SFB) com ou sem a ACLF. Os núcleos apoptóticos foram avaliados por laranja de acridina em microscopia de fluorescência. Os valores indicam a média \pm ES de 6 experimentos independentes. Os valores não diferiram estatisticamente (ANOVA/Dunett)

% de células apoptóticas	
Controle	ACLF
18,6 \pm 1,0	17,0 \pm 3,8

4.4 Inibição de apoptose de células endoteliais induzida rACLF

Neste experimento, foi estudado o efeito antiapoptótico da rACLF, quando a morte celular em HUVECs foi induzida por deprivação de SFB. Como demonstrado na figura 6, a rACLF (630 e 1050 nM) apresentou atividade inibitória na morte celular induzida por deprivação de SFB.

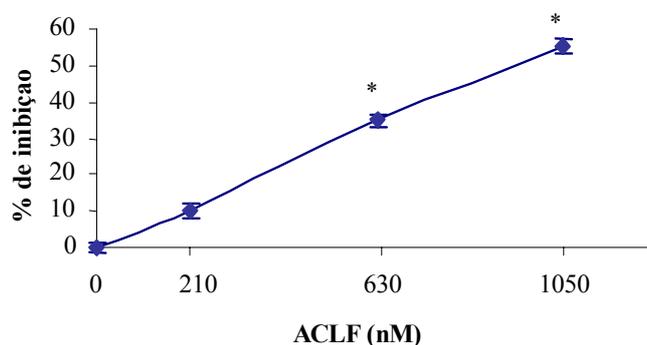


Figura 7. Inibição de apoptose de HUVECs mediada por rACLF. HUVECs foram incubadas durante 24 h com RPMI (1% SFB) sem ou com diferentes concentrações de rACLF. Os núcleos apoptóticos foram avaliados por laranja de acridina em microscopia de fluorescência. Os valores representam a média \pm ES de 4 experimentos independentes * $p < 0,05$ vs controle. (ANOVA, Dunett)

4.5 Efeito rACLF sobre a expressão de ICAM-1

A ICAM-1 é uma molécula da superfamília das IgG presente na membrana das células endoteliais. Sua expressão é aumentada significativamente por moléculas pró-inflamatórias. Uma *up-regulation* de ICAM-1 permite e assegura a transmigração dos leucócitos através do endotélio vascular até os sítios de infecção (ROTHLEIN *et al.*, 1986).

A incubação das células com rACLF (50 μ M), produziu um aumento estatisticamente significativo nos níveis de expressão de ICAM-1 quando comparados às células controles (Figura 8).

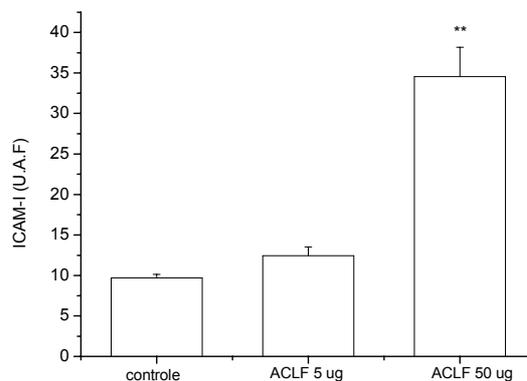


Figura 8. Expressão de ICAM-1 induzida por ACLF. HUVECs foram estimuladas com ACLF (5 e 50 μ g) por 1h. Após incubação, o meio foi substituído por RPMI com 10% de SFB e a expressão de ICAM-1 foi determinada após 24h por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média \pm ES da intensidade de fluorescência de 4 experimentos independentes. ** $p < 0,01$ (ANOVA, Dunett)

4.6 Efeito rACLF na secreção de Interleucina-8

A Interleucina-8 pertence à família das citocinas de baixa massa molecular (8 kDa) e é produzida por várias células, especialmente macrófagos e células endoteliais. Está envolvida na inflamação e migração celular, além de ser um potente indutor da quimiotaxia de neutrófilos (KOCH *et al.* 1992)

O tratamento das HUVECs com ACLF (5 e 25 μ g) resultou no aumento significativo da produção de IL-8. (Figura 9)

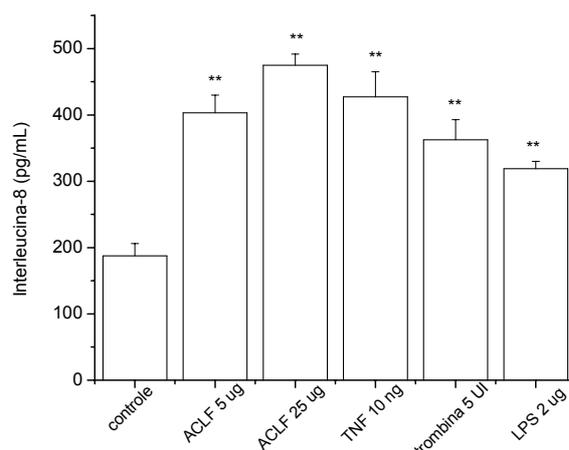


Figura 9. Produção de interleucina-8 pelas HUVECs. As células foram estimuladas com ACLF (5 e 25 μ g) por 1h. Após incubação, o meio foi substituído por RPMI com 10% de SFB e a produção de IL-8 foi determinada após 24h por ELISA. TNF, trombina e LPS foram utilizados como controles positivos. Os resultados representam a média \pm ES de 4 experimentos independentes. ** $p < 0,01$ (ANOVA, Dunett).

4.7 Efeito rACLF na secreção de Prostaglandina PGI₂

Uma das principais vias do metabolismo do ácido araquidônico, a via da ciclooxigenase, leva a produção de prostaglandinas. A PGI₂ tem ação em processos inflamatórios causando vasodilatação potencializando a formação do edema.

A incubação das HUVECs com rACLF estimulou significativamente a produção de PGI₂ de maneira semelhante a estimulação das células por TNF e LPS (Figura 10).

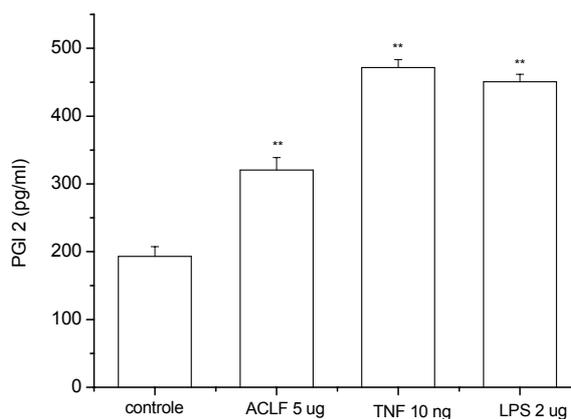


Figura 10. Produção de PGI₂ pelas HUVECs. As células foram estimuladas com rACLF 5 μ g. Após 1h de incubação, a produção de PGI₂ foi determinada pelo acúmulo do metabólito 6-keto-PGF_{1 α} no meio de cultura, por ELISA. TNF e LPS foram utilizados como controles positivos. Os resultados representam a média \pm ES de 4 experimentos independentes. ** $p < 0,01$ (ANOVA, Dunnett)

4.8 Efeito da rACLF na expressão de DAF (fator de aceleração do decaimento)

A DAF é uma glicoproteína de superfície, que atua desestabilizando a C3 e a C5 convertases, prevenindo desta maneira a formação de complexos de ataque à membrana e lise celular (WALPORT, 2001; LUBLIN & ATKINSON, 1989)

Como demonstrado na figura 11, a incubação da HUVECs com rACLF (50 μ M) resultou no aumento da expressão do DAF, sendo este semelhante àquele produzido com estimulação da HUVECs com TNF.

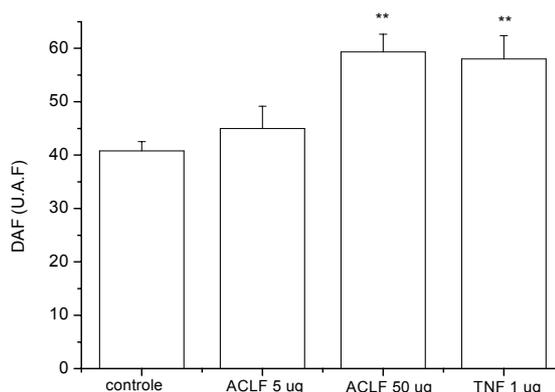


Figura 11. Expressão de DAF induzida por ACLF. HUVECs foram estimuladas com ACLF (5 e 50 μ g) por 1h. Após incubação, o meio foi substituído por RPMI com 10% de SFB e a expressão de DAF foi determinada após 24h por citometria de fluxo. TNF foi utilizado como controle positivo. Os resultados representam a média \pm ES da intensidade de fluorescência de 4 experimentos independentes. ** $p < 0,01$ (ANOVA, Dunnett)

4.9 Efeito da rACLF em fibroblastos humanos

A rACLF não teve efeito citotóxico em fibroblastos humanos. Além disso, nos poços onde os fibroblastos foram incubados com rACLF (30 e 60 nM) durante 24 h, ocorreu um aumento na intensidade da formação do produto resultante da clivagem do MTT, sugestivo de proliferação celular. Porém, após 48 h de incubação somente nos poços onde as células foram incubadas com rACLF 60 nM ocorreu aumento na intensidade do produto formazam, quando comparadas às células não tratadas. (Figura 12).

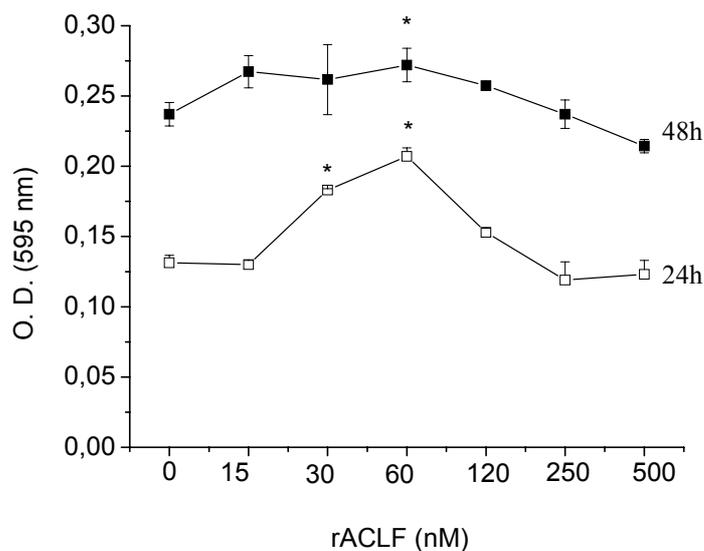


Figura 12. Viabilidade de fibroblastos humanos tratados com rACLF. As células foram incubadas com diferentes concentrações de rACLF por 24h e 48h. A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. * $p < 0,05$; (ANOVA/Dunett)

Como demonstrado na figura 13, a análise microscópica das culturas revelou que a incubação de fibroblastos com rACLF não alterou a morfologia das células.

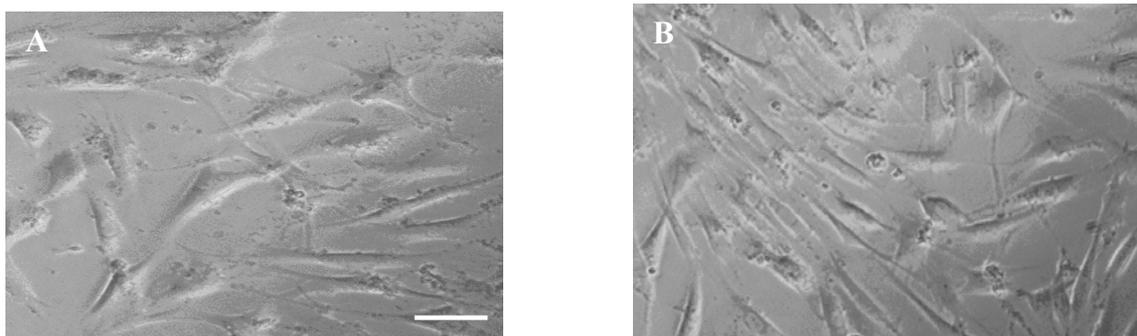


Figura 13. Análise morfológica de fibroblastos humanos. As células foram incubadas por 48 h na ausência (A) ou presença de 250 nM de rACLF (B) e analisadas por microscopia de luz. (barra: 40 μ m).

A análise de proteases secretadas pelos fibroblastos nos meios condicionadas foi realizada, por zimografia em gel de poliacrilamida copolimerizado com gelatina. Neste

experimento, foi observado que não houve variação no padrão de secreção de proteases por fibroblastos incubados com rACLF. Como demonstrado na figura 14, foram identificadas bandas com atividade gelatinolíticas de 72 kDa, 66 kDa e 20 kDa, correspondentes as formas inativa, ativa e degradada, respectivamente de MMP-2 (gelatinase-A)

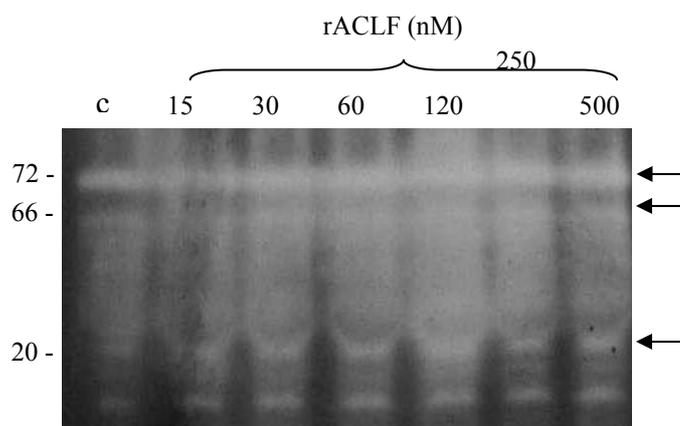


Figura 14. Zimograma em gelatina. Análise eletroforética das proteases secretadas por fibroblastos humanos incubados com diferentes concentrações de rACLF por 48h. As setas indicam as bandas de degradação da gelatina.

A secreção de MMP-2 (gelatinase A) por fibroblastos foi confirmada por western blot. Em todas as condições de cultivo, (com ou sem rACLF). As formas inativa (72 kDa) ativa (66kDa) e degradadas (50 e 20 kDa) da MMP-2 foram detectadas (Figura 15)

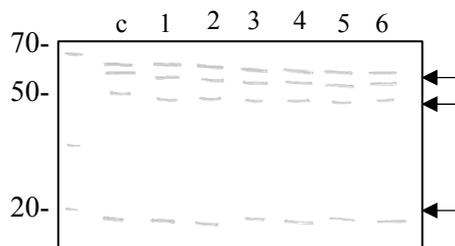


Figura 15. Identificação de MMP-2 secretadas nos sobrenadantes dos meios condicionados de fibroblastos incubados com rACLF por 48h. C: controle, canaletas 1-6: 15, 30, 60, 120, 250 e 500 nM de rACLF.

4.10 Detecção de citocinas/quimiocinas no sobrenadante de fibroblastos humanos incubados com rACLF.

A figura 16 representa as citocinas/quimiocinas que podem ser detectadas nas membranas utilizadas. As IgGs biotinizadas com sinal positivo (Pos) servem para a identificar a orientação da membrana e comparar a intensidade do sinal.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Pos	Pos	Neg	Neg	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO-alfa
2	Pos	Pos	neg	Neg	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO-alfa
3	IL-1 alfa	IL-2	IL-3	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
4	IL-1 alfa	IL-2	IL-3	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
5	IL-13	IL-15	IFN-gama	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MIG	Rantes
6	IL-13	IL-15	IFN-gama	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MIG	Rantes
7	TGF-beta1	TNF a	TNF-beta	Blank	Blank	Blank	Blank	Pos
8	TGF-beta2	TNF a	TNF-beta	Blank	Blank	Blank	Blank	Pos

Figura 16. Representação dos anticorpos anti-citocinas ligados à membrana.

Nossos resultados demonstraram que fibroblastos humanos incubados sem a enzima secretam IL-8. Quando as células foram tratadas com rACLF (120 nM), além da IL-8, foram detectadas as quimiocinas GRO e MCP-1 no sobrenadante da cultura (Figura 17)

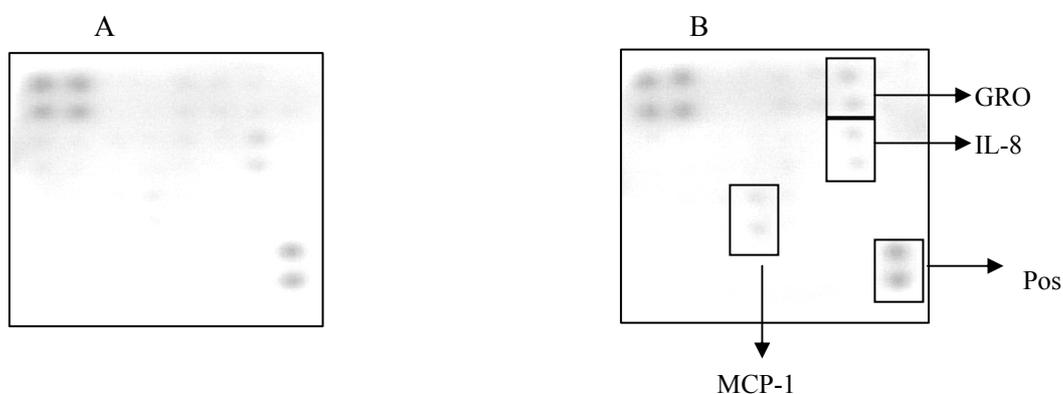


Figura 17. Detecção de citocinas secretadas por fibroblastos humanos incubados por 48h sem rACLF (A) e com 120 nM de rACLF.

4.11 Efeito da rACLF em células tumorais HeLa

Quando as células HeLa foram incubadas por 48h com rACLF nas concentrações de 15 a 500 nM, foi observado que ocorreu redução na viabilidade celular. Este efeito foi observado tanto em 24h quanto 48h de incubação, como demonstra a figura 18.

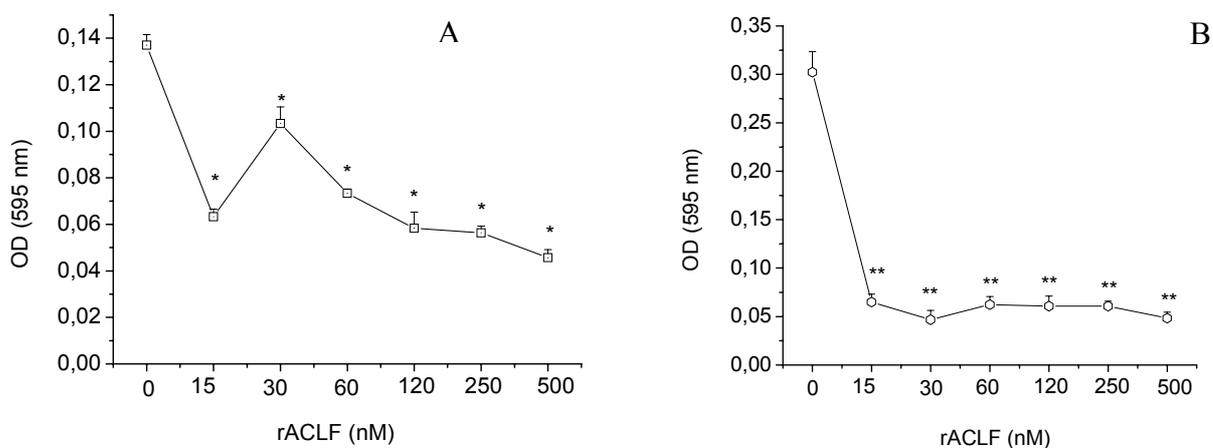


Figura 18. Efeito de diferentes concentrações de rACLF na viabilidade de células HeLa em 24h (A) ou 48h (B) de incubação a 37°C contendo 5% de CO₂. Os resultados representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata. * p< 0,05; ** p< 0,01 (ANOVA/Dunett).

Além disso, quando as células foram visualizadas sob microscópio invertido (Fig 19), foi observado que a enzima provocou alteração na morfologia celular evidenciado por desgrudamento e arredondamento das células (Fig 19 B).

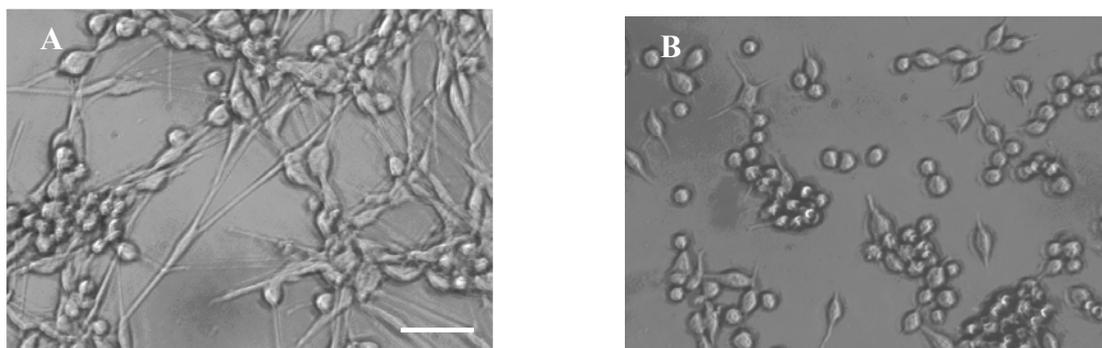


Figura 19. Morfologia de HeLa tratadas com rACLF. As células foram incubadas por 48 h na ausência (A) ou presença de 60 nM de rACLF (B) e analisadas por microscopia de luz. (barra: 40 μ m).

Os sobrenadantes dos meios condicionados de células HeLa incubadas com rACLF por 48h foram submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida copolimerizado com gelatina. Como demonstrado na figura 20, em todas as condições foi observada a secreção de proteases de aproximadamente 116, 97 e 45 kDa.

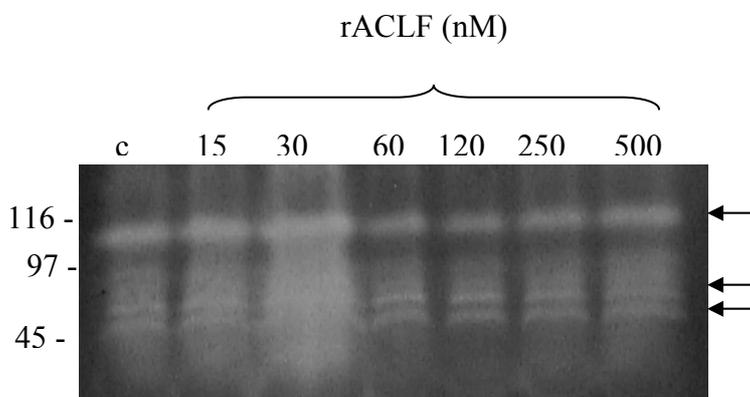


Figura 20. Zimograma em gelatina. Análise eletroforética dos meios condicionados de células HeLa incubadas com várias concentrações de rACLF por 48h. O sobrenadante de células incubadas sem a enzima foi utilizado como controle (c). As setas indicam as bandas de degradação do substrato.

4.12 Efeito da rACLF em células tumorais MDA- MB-231 e MCF-7

Como foi observada a sensibilidade das células HeLa na presença da rACLF, decidimos estudar o efeito da enzima na viabilidade de outras linhagens tumorais. Para esta finalidade foram utilizadas as linhagens MDA-MB – 231 (carcinoma mamário, migratória e invasiva) e MCF-7 (carcinoma mamário, dependente de estrógeno).

Quando as células MDA-MB-231 foram incubadas com rACLF por 24h, não foi observada a redução na viabilidade (fig. 21 A). Seguindo-se 48h, somente células incubadas na presença de 500 nM de rACLF apresentaram redução na viabilidade (Figura 21 B)

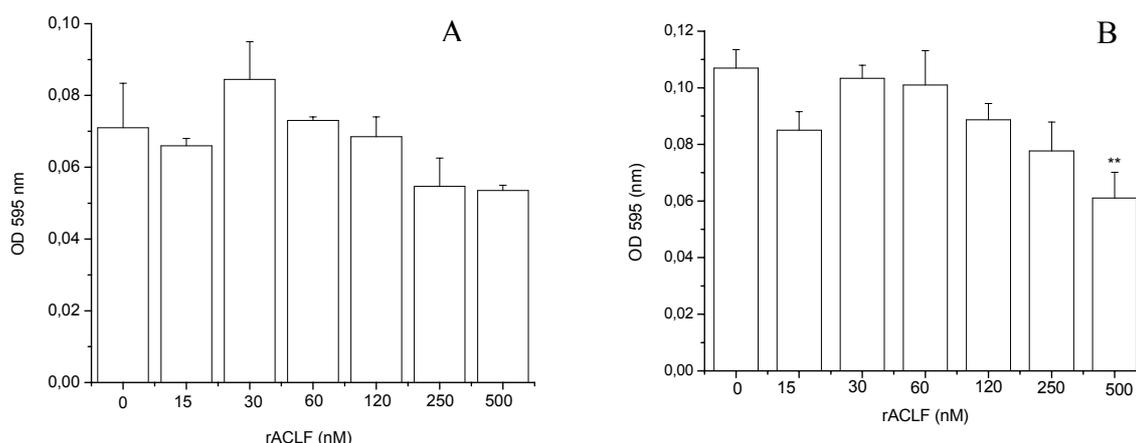


Figura 21. Efeito de diferentes concentrações de rACLF na viabilidade de células MDA-MB 231 em 24h (A) ou 48h (B) de incubação a 37°C contendo 5% de CO₂. Os resultados representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata. * p< 0,05; ** p< 0,01 (ANOVA/Dunnett).

A incubação de células MCF-7 na presença de rACLF por 24h, causou redução na viabilidade celular quando as células foram incubadas com a enzima nas concentrações de 30 a 500 nM, como observado na figura 22.

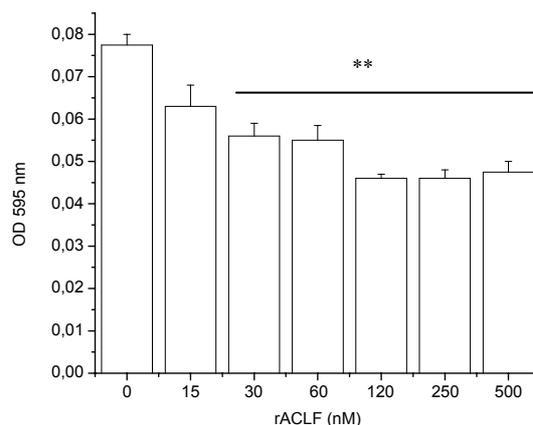


Figura 22. Efeito de diferentes concentrações de rACLF na viabilidade MCF-7 em de incubação a 37°C contendo 5% de CO₂. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. * p< 0,05; ** p< 0,01 (ANOVA/Dunnett).

4.13 Atividade da rACLF sobre proteínas da matriz extracelular: laminina, fibronectina, trombospondina e colágeno IV.

A laminina é uma proteína heterotrimérica $\alpha 1$ (400 kDa) $\beta 1$ e $\gamma 1$ (200 kDa cada) que juntamente com o colágeno tipo IV, nidogenio e perclam, constitui um dos principais componentes das membrana basais. Como demonstrado na figura 23, duas principais bandas de alta massa molecular foram observadas após a incubação da laminina sem a enzima (controle). Seguidas 2h de incubação com a enzima, observou-se o aparecimento de uma banda de aproximadamente 60 kDa, que tornou-se mais evidente nas alíquotas correspondentes a 6h e 24h de incubação com a rACLF.

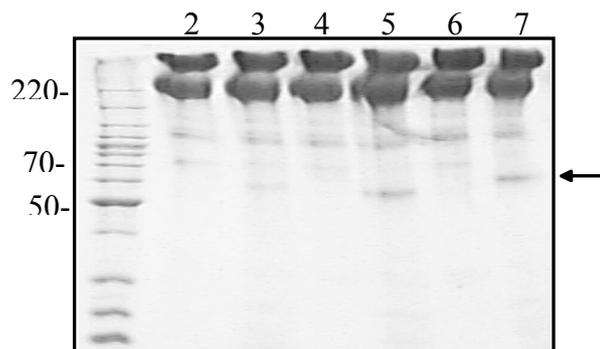


Figura 23. Degradação da laminina pela rACLF. As canaletas 2, 4 e 6 correspondem a laminina incubada sem a enzima por 2h, 6h e 24h respectivamente. As canaletas 3, 5 e 7 correspondem a laminina incubada com rACLF por 2h, 6h e 24h.. A seta indica o produto de degradação.

A fibronectina é uma glicoproteína heterodimérica (230-280 kDa) que apresenta as duas subunidades ligadas covalentemente por ponte dissulfeto próximo a região carboxi-terminal. A fibronectina incubada por 24h sem a enzima apresentou além de banda de alta massa molecular de aproximadamente 220kDa, outras duas bandas (100 e 60 kDa), que podem ser resultados de hidrólise ou indicação que a proteína não estava totalmente pura. A banda de maior massa molecular foi parcialmente degradada após 2h e 6h de incubação com a rACLF, resultando em um produto de hidrólise de aproximadamente 150 kDa (indicado pela seta) (Fig 24). Após 24h de incubação com a enzima, a banda de alta massa molecular foi quase totalmente degradada e vários produtos de baixa massa molecular resultantes da hidrólise foram observados.

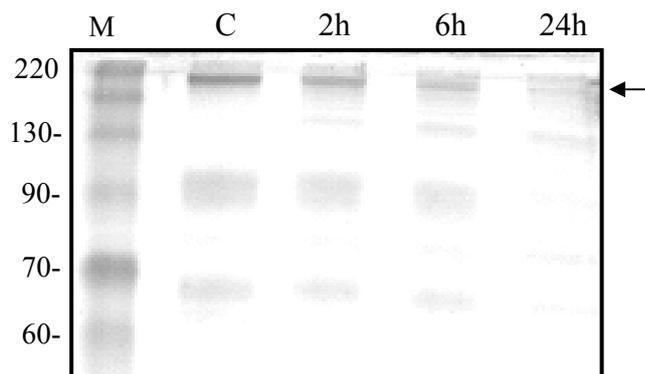


Figura 24. Degradação da fibronectina pela rACLF. A fibronectina foi incubada com a rACLF a 37 °C. Após vários intervalos de tempo, alíquotas foram retiradas e analisadas por SDA-PAGE. C: fibronectina incubada sem a enzima por 24h. As setas indicam os produtos de degradação. M: marcador de massa molecular

A TSP é uma glicoproteína homotrimérica de aproximadamente 180 kDa. Após a incubação da TSP por 2h, observou-se a hidrólise parcial da banda de alta massa molecular, que se tornou mais evidente após 6h e 24 h de incubação com a enzima. Com 24h de incubação a principal banda foi quase totalmente degradada pela rACLF (Figura 25).

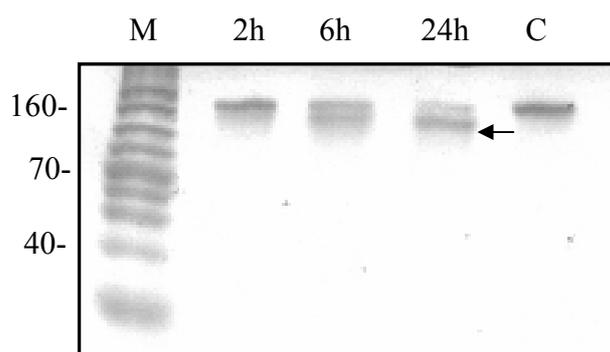


Figura 25. Degradação da TSP pela rACLF. A TSP foi incubada com a enzima a 37 °C. Após vários intervalos de tempo, alíquotas foram removidas e analisadas por SDS-PAGE. C: Tsp incubada sem a enzima por 24h. M: marcador de massa molecular. A seta indica o produto de degradação do substrato.

O colágeno IV incubado por 24 h sem a rACLF apresentou duas principais bandas (110 e 120 kDa). Seguida da incubação com a enzima, a hidrólise parcial da proteína foi evidenciada como mostra a figura 26. Após 6h e 24 h de incubação vários produtos de hidrólise foram observados (Figura 26).

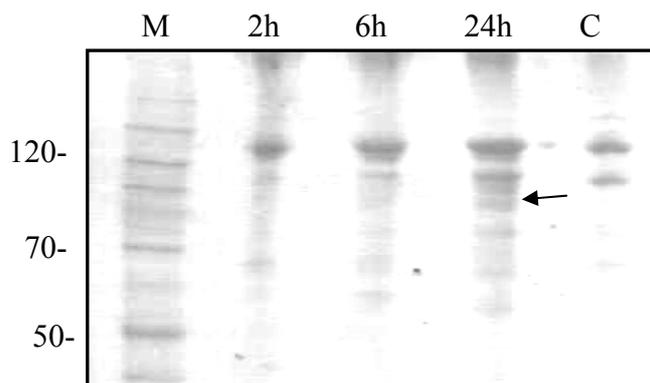


Figura 26. Degradação do col IV pela rACLF. O col IV foi incubado com a rACLF a 37 °C. Após vários intervalos de tempo, alíquotas foram removidas e analisadas por SDS-PAGE. C: ColágenoIV incubado sem a enzima por 24h. M: marcador de massa molecular

4.14 Efeito da rACLH em células normais e tumorais

Como um dos objetivos do trabalho foi comparar as atividades das enzimas rACLF e rACLH, os testes de viabilidade celular foram paralelamente realizados com a enzima recombinante rACLH. Semelhante a ação da rACLF, a rACLH não teve efeito citotóxico quando incubada com fibroblastos humanos por 24 ou 48h (fig 27 A e B).

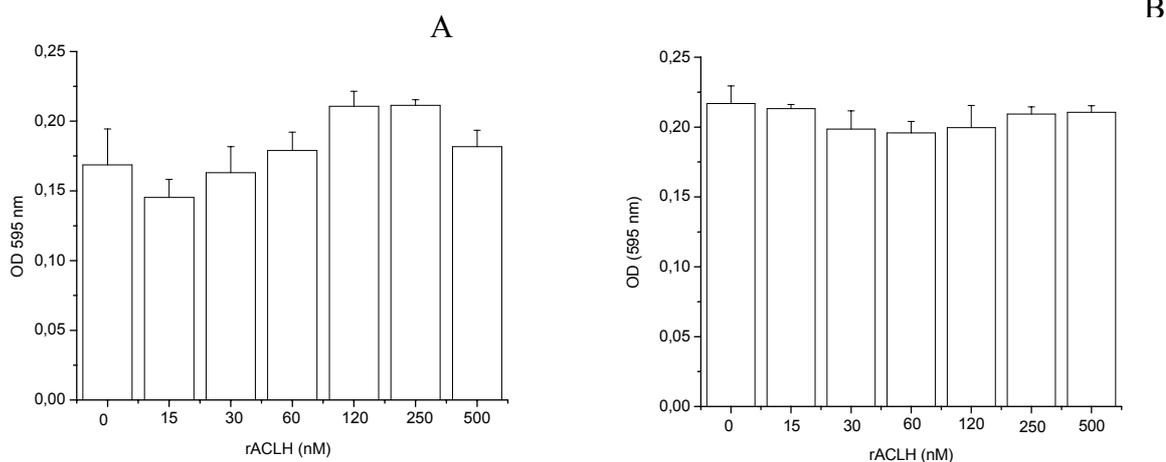


Figura 27. Efeito de diferentes concentrações de rACLH na viabilidade de fibroblastos humanos em 24h (A) ou 48h (B) de incubação a 37°C contendo 5% de CO₂. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados não diferiram estatisticamente (ANOVA/Dunett)

Porém, a incubação de rACLH com células HeLa também resultou em redução na viabilidade celular tanto em 24h (fig 28 A), quanto em 48h (fig 28 B), demonstrando dessa maneira a sensibilidade desta linhagem celular às enzimas rACLF e rACLH.

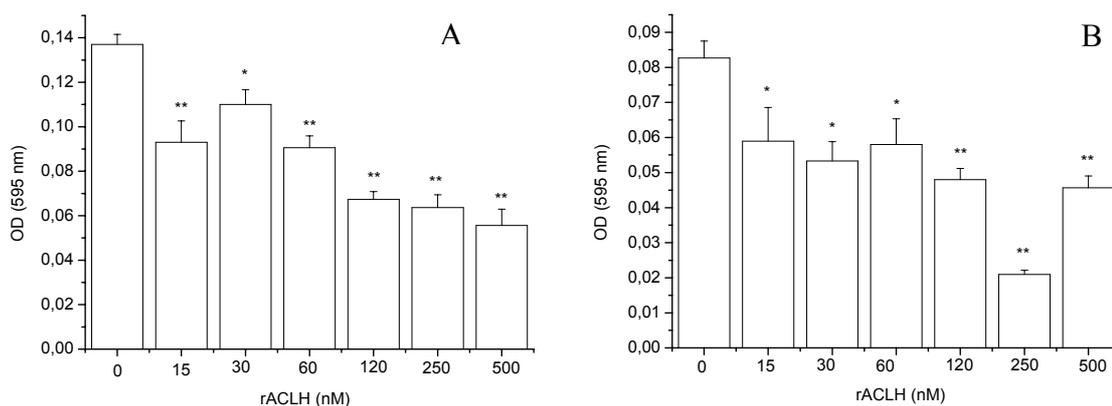


Figura 28. Efeito de diferentes concentrações de rACLH na viabilidade de células HeLa em 48h (A) ou 24h (B) de incubação a 37°C contendo 5% de CO₂. Os resultados representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata. * p < 0,05; ** p < 0,01 (ANOVA/Dunett).

Por outro lado, a presença de rACLH em culturas de células MDA-MB-231 não causou efeito citotóxico intenso. Somente quando estas células foram incubadas com 500 nM de rACLH por 24h, foi observada redução na viabilidade celular (fig 29 A). Este efeito não foi observado quando as células foram incubadas com a enzima por 48h, (fig 29 B).

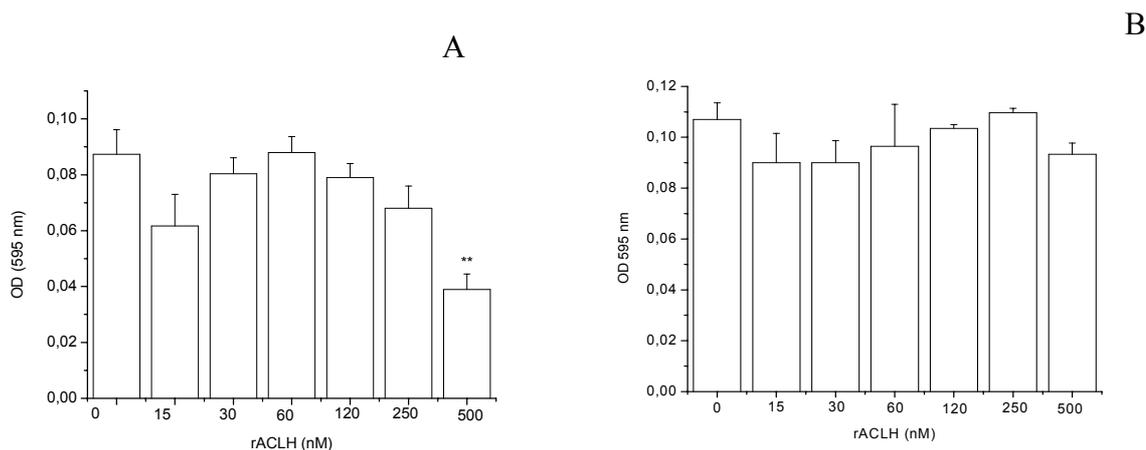


Figura 29. Efeito de diferentes concentrações de rACLH na viabilidade de células MDA-MB 231 em 24h (A) ou 48h (B) de incubação a 37°C contendo 5% de CO₂. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. * p< 0,05; ** p< 0,01 (ANOVA/Dunnett).

Na linhagem celular MCF-7 a rACLH também reduziu a viabilidade celular já em 24h de incubação, em todas as concentrações testadas (Figura 30).

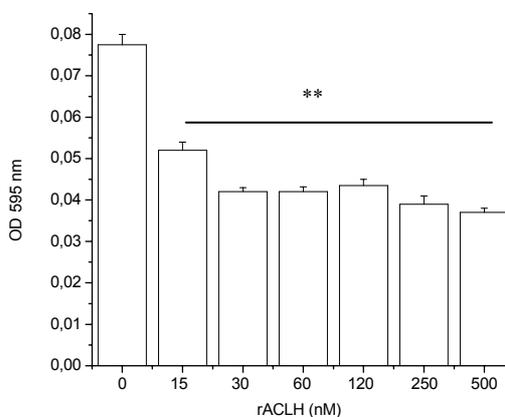


Figura 30. Efeito de diferentes concentrações de rACLH na viabilidade MCF-7 em de incubação a 37°C contendo 5% de CO₂. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. ** p< 0,01 (ANOVA/Dunnett).

4.15 Parâmetros cinéticos para a hidrólise do substrato Abz-LVEALYQ-EDDnp pelas enzimas rACLF e rACLH

As enzimas (0,44 μ M) foram incubadas com o substrato (10 μ M) em Tris -HCl 50 mM pH 8,0 a 37⁰C. As hidrólises foram monitoradas pela medida das fluorescências a λ 420 nm de emissão e λ 320 nm de excitação. Neste ensaio foi demonstrado que a rACLF apresenta maior eficiência enzimática sobre o substrato testado, quando comparada com a rACLH (tabela 6).

Tabela 6. Estudo cinético das enzimas rACLF e rACLH sobre o substrato fluorogênico Abz-LVEALYQ-EDDnp

	rACLF	rACLH
Km	5,08 μ M,	19,45 μ M
Kcat	0,0119 s ⁻¹	0,0071 s ⁻¹
Kcat/Km	2,33 mM ⁻¹ s ⁻¹	0,38 mM ⁻¹ s ⁻¹

4.16 Atividade proteolítica da rACLF sobre substratos fluorogênicos

Como foi demonstrado que a rACLF hidrolisa o peptídeo central da cadeia β da insulina entre os aminoácidos A-L (RAMOS *et al.*, 2003), a atividade proteolítica da ACLF também foi testada contra peptídeos fluorogênicos com variações de aminoácidos. A tabela 7 demonstra os parâmetros cinéticos obtidos.

Tabela 7. Parâmetros cinéticos para a hidrólise de substratos de fluorescência apagada pela rACLF

substrato	K _m (μ M)	K _{cat} (s ⁻¹)	K _{cat} /K _m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
Abz-LVEALYQ-EDDnp	5.7	0.019	2.33
Abz-KLAFSKQ-EDDnp	20.8	0.011	0.55
Abz-KLGFSKQ-EDDnp	22.7	0.002	0.10
Abz-KLKFSKQ-EDDnp	65.8	0.0009	0.01
Abz-KLRFAKQ-EDDnp	5.4	0.0004	0.08

4.17 Atividade proteolítica da rACLF, e rACLH sobre pró-insulina

A incubação da pró-insulina com a rACLF resultou no aparecimento de três produtos de hidrólise. Já a incubação do substrato com a rACLH resultou em apenas um produto de hidrólise de massa molecular diferente daqueles produzidos pela rACLF como demonstrado na figura 31.

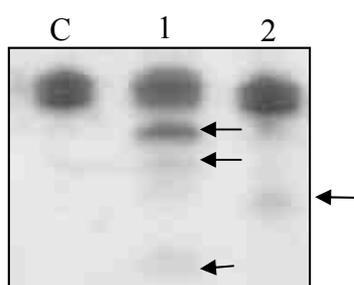


Figura 31. Degradação da pró-insulina por rACLF (1) e rACLH (2). C: substrato incubado sem enzima.

5. Discussão

Dentre os diversos componentes encontrados nas peçonhas de serpentes viperídicas, as metalopeptidases constituem uma classe de enzimas que interferem na coagulação e hemostasia, sendo responsáveis por diversos efeitos observados no envenenamento como hemorragia, edema, hipotensão, hipovolemia, inflamação e necrose (GUTIÉRREZ E RUCAVADO, 2000, FOX E SERRANO, 2005).

Neste trabalho, foi estudado o efeito da rACLF, uma metalopeptidase desprovida de atividade hemorrágica sobre células endoteliais (HUVECs), células tumorais (HeLa, MDA-MB-232 e MCF-7) e não tumorais (fibroblastos humanos). Além da ação sobre as células, também foi estudada a atividade proteolítica da rACLF sobre diversos substratos, como proteínas da matriz extracelular, pró-insulina e peptídeos sintéticos.

Nossos resultados demonstraram que a incubação de rACLF com HUVECs não altera a morfologia das células nem induz morte celular. Além disso, quando a apoptose foi induzida nestas células por deprivação de soro fetal bovino, foi observado que a rACLF teve efeito protetor, dose dependente, ou seja, quanto maior a concentração de rACLF no meio, menor a proporção de células apoptóticas.

No sobrenadante de HUVECs incubadas com rACLF foi observado um aumento dos níveis da quimiocina CXC IL-8. Esta quimiocina é um potente quimiotático para polimorfonucleares, principalmente neutrófilos (BORISH & STEINKE, 2003). A expressão e secreção de IL-8 pode ser induzida por diversos estímulos inflamatórios (IL-1 β , IL-1 α , TNF, LPS, trombina, histamina) em diferentes células, incluindo células endoteliais. Substâncias secretagogas tais como trombina, epinefrina, histamina induzem a fusão dos corpos de Weibel-Palade (WP) com a membrana citoplasmática e a liberação do conteúdo armazenado (WOLF *et al.*, 1998, DATTA & EVENSTEIN, 2001).

Schatner *et al.* (2005), demonstraram que as SVMPs Berythactivase, PIII não hemorrágica de *Bothrops erythromelas* e Jararagina, PIII hemorrágica de *B. jararaca* também promovem a liberação de IL-8 dos corpos de WP, mas não são capazes de induzir sua síntese. Estes resultados evidenciam que tais SVMPs causam ativação imediata das CE, independente da síntese de proteínas (BURGOYNE & MORGAN, 2003).

Em adição ao seu papel na inflamação, as quimiocinas CXC ELR+, como a IL-8, regulam a angiogênese e promovem a migração e proliferação de células endoteliais (STRIETER *et al.*, 1995, 2005). LI *et al.* (2003) demonstraram que as HUVECs expressam constitutivamente os receptores de quimiocinas CXCR1 e CXCR2. A adição de IL-8 recombinante em culturas de HUVECs inibe a apoptose, promove a expressão de genes anti-apoptóticos e aumenta a produção de MMP-2 e -9 (LI *et al.*, 2003). Desse modo, a IL-8 tem sido designada como um potente fator de sobrevivência para as células endoteliais, pois modula a via anti-apoptótica, interagindo com seus receptores nas CE. O mecanismo de regulação da angiogênese pela IL-8 pode ser devido ao aumento da proliferação celular, pela expressão de genes anti-apoptóticos e em parte pela ativação de MMP-2, -9.

AS SVMPs ativam a cascata do complemento (FARSKY *et al.*, 2000), um conjunto de proteínas que modulam a resposta inflamatória (WALPORT, 2001). Com a finalidade de proteger as células dos danos causados pela ativação do complemento, uma variedade de fatores solúveis ou ligados à membrana são expressos. Estes fatores incluem as proteínas de superfície celular DAF (CD 55), MCP (CD 36), protectina (CD 59) e CR 1(CD35). A proteína DAF é expressa constitutivamente pelas células endoteliais, entretanto sua expressão aumenta pela estimulação com trombina, LPS e TNF- α . A DAF atua evitando a formação e acelerando o decaimento das C3 e C5 convertases, enzimas centrais na amplificação da cascata do complemento (MIWA & SONG, 2001).

Nossos resultados demonstraram que a rACLF induziu a expressão de DAF nas HUVECs. O aumento da expressão de DAF na superfície celular, juntamente com a expressão de IL-8 e a ausência do efeito citotóxico e hemorrágico sugere que a ACLF nativa exerça um efeito protetor nas CE durante a injúria vascular causada pelo envenenamento.

Durante o processo inflamatório, não somente ocorre um aumento nos níveis de citocina e quimiocinas, como também na expressão de moléculas de adesão celular que participam no recrutamento, adesão e transmigração dos leucócitos do endotélio para os sítios de inflamação. A rACLF modulou a expressão da molécula de adesão ICAM-1 nas HUVECs. Silva *et al.* (2003) também observaram o aumento de ICAM-1 em HUVECs incubadas com Berythactivase. Por outro lado, a Jararagina, mesmo em altas concentrações não modificou os níveis de ICAM -1 nestas células (SCHATNER *et al.*, 2005).

Nas sobrenadantes de HUVECs tratadas com rACLF também foi observado um aumento dos níveis de prostaciclina (PGI₂). A PGI₂, juntamente com o óxido nítrico (NO), são potentes vasodilatadores e inibidores da agregação plaquetária. A estimulação dos receptores endoteliais pela rACLF com conseqüente liberação de PGI₂ pode estar relacionada com a hipotensão que ocorre em envenenamentos humanos por picada de serpentes (ROSENFELD, 1971). O aumento na produção de NO e PGI₂ também foi observado em HUVECs tratadas com Insularinase A (MODESTO *et al.*, 2005), Berythactivase e Jararagina (SCHATTNER *et al.*, 2005)

A rACLF não teve efeito citotóxico em fibroblastos humanos nem alterou a morfologia dessas células. Além disso, foi observado um aumento na redução do MTT quando os fibroblastos foram incubados com rACLF (30 e 60 nM) por 24h. Esses resultados sugerem que nestas concentrações a enzima pode induzir proliferação celular.

Outra possibilidade seria o efeito de proteção contra morte celular, como observado em HUVECs tratadas com rACLF. Entretanto, para comprovar o efeito de proliferação celular existem métodos mais apropriados que determinam a síntese de DNA.

No sobrenadante de fibroblastos incubados com 120 nM de rACLF foi detectada a secreção das quimiocinas IL-8, MCP-1 e GRO. Estes resultados corroboram com aqueles descritos por Gallagher *et al.*, 2005. Estes autores estudaram o perfil da expressão gênica de fibroblastos humanos tratados com Jararagina, demonstrando que esta SVMP causa aumento na expressão de genes associados à inflamação (IL-1 β , IL-6, IL-8, GRO- α e GRO- β). Outras metalopeptidases de veneno de serpentes foram reportadas, como indutoras de proteínas associadas ao processo inflamatório (RUCAVADO *et al.*, 2002, ZAMUNER *et al.* 2005).

As quimiocinas apresentam efeito pleiotrópico na imunidade, regulação da angiogênese e metástases. Este grupo de citocinas também regula a polimerização e despolimerização de actina nos leucócitos para movimentos e migração e funcionam como quimoatraentes. As quimoquinas CXC são proteínas ligantes de heparina que disparam funções na regulação da angiogênese. Esta família de quimoquinas apresenta quatro resíduos de cisteína altamente conservados. O N-terminal de várias quimoquinas CXC contém três resíduos de aminoácidos (Glu-Leu-Arg, motivo chamado de “ELR”), que imediatamente precedem o primeiro motivo de cisteína. As quimoquinas CXC com motivo ELR (ELR+) promovem angiogênese. Ao contrário, as quimoquinas CXC que são em geral induzíveis por interferon e perderam o motivo ERL (ERL-) inibem a angiogênese (STRIETER *et al.*, 1995, MOORE *et al.*, 1998). A IL -8 é um potente membro da família de CXC com motivo ELR+ e pode ser induzida em várias células, incluindo monócitos, linfócitos, fibroblastos, endoteliais e queratinócitos (ROEBUCK,1999).

A GRO é uma proteína de 8 kDa que além de estimular a mitogênese em células normais e tumorais, promove quimiotaxia e desgranulação de neutrófilos. A MCP-1 exerce efeito quimiotático sobre monócitos e linfócitos T. Além disso, está envolvida em processos inflamatórios e angioproliferativos em patologias cerebrais e da retina. Os resultados demonstrados neste trabalho sugerem que o efeito da rACLF na viabilidade e proteção contra morte celular observados em HUVECs e fibroblastos, podem estar associados à modulação de moléculas como GRO e IL-8 pela enzima..

As quimoquinas CXC angiogênicas promovem a angiogênese por mecanismos adicionais via indução da expressão de metalopeptidases degradadoras da matriz extracelular (MMPs), tais como MMP-2 e MMP-9 (LUCA *et al.*, 1997).

A análise dos sobrenadantes dos fibroblastos incubados com a rACLF demonstrou que não houve diferença na secreção de MMP-2 (gelatinase A).

A atividade de MMP é associada a condições fisiológicas e patológicas que envolvem a degradação e o remodelamento da matriz extracelular (MEC). As proteínas da MEC são os substratos tradicionais para MMPs. Entretanto McCawley & Martrisian, 2001, demonstraram que receptores celulares e moléculas de adesão também são alvos de MMPs. Estas atividades também foram observadas em SVMP. A graminelysina, PI de *Trimeresurus gramineus* teve atividade sobre componentes da MEC e sobre proteínas que fazem junções aderentes célula-célula (caderinas e cateninas), resultando em apoptose (WU & HUANG, 2003). As MMPs também estão envolvidas no crescimento e proliferação celular. Existem mecanismos para explicar o crescimento celular mediado por MMP. Um deles é a clivagem de proteínas de matriz associadas à fatores de crescimento. O FGF e o TGF- β , por exemplo, são fatores que apresentam forte afinidade por componentes da matriz. Desse modo, a proteólise de moléculas da matriz resulta na liberação desses fatores associados à matriz (IMAI *et al.*, 1997).

A rACLF clivou proteínas da MEC como fibronectina, laminina, trombospondina e colágeno IV. A atividade da enzima sobre estes componentes pode tanto contribuir para o efeito tóxico da rACLF em células tumorais, resultando em desprendimento, quanto pode ser responsável pela geração de fragmentos biologicamente ativos, resultantes da proteólise de proteínas da MEC.

O efeito citotóxico tanto da rACLF quanto da rACLH sobre células tumorais como HeLa e MCF-7 pode ser resultado de desprendimento das células, o que levaria a morte celular conhecida como anoikis, ou ainda devido a ação destas enzimas sobre proteínas presentes na membrana celular como por exemplo integrinas e caderinas. Nesta última situação a morte celular antecede ao desgrudamento, já em anoikis, o desgrudamento das células é que levaria a morte. Para elucidar o mecanismo de citotoxicidade exercido pelas enzimas rACLF e rACLH sobre células tumorais, outros estudos precisariam ser realizados.

A atividade citotóxica das enzimas estudadas especificamente em células tumorais, pode estar relacionada a diferenças na MEC produzida e na expressão de integrinas pelas células. Tang *et al.* (2004), demonstraram que culturas primárias de osteoblastos murinos e de osteosarcoma apresentam expressão diferenciada de integrinas e do microambiente de MEC. Estes autores verificaram que a incubação destas células com crovidisina, uma PIII de *Crotalus viridis*, resultou no desgrudamento somente da linhagem tumoral de osteosarcoma.

Díaz *et al.* (2005) verificaram que não há correlação entre o método MTT e a análise de fragmentação do DNA, uma vez que pelo método do MTT, a BaP1 não foi citotóxica para HUVECs, mesmo em concentrações maiores que 100 ug/ml, embora a fragmentação do DNA tenha ocorrido nas primeiras horas de incubação. Estes autores demonstraram que a apoptose ocorre precocemente embora a disrupção da membrana

celular só é evidente após 24 h de incubação. Além disso, a apoptose induzida por BaP1 foi independente de Bcl-x1 e Bax, mas associada com a ativação da caspase-8 e aumento de cFLIP_L (*cellular FLICE-inhibitory protein*)(DIAZ *et al.*, 2005). A graminelysina também causou apoptose em HUVECs. Entretanto, diferente da ação da BaP1, na apoptose induzida por graminelysina ocorre ativação de caspase-3 e diminuição da proporção Bcl-x1/Bax (WU e HUANG, 2001). Foi demonstrado também que a apoptose ocorreu antes do desprendimento, uma vez que a PARP (Poly[ADP-ribose] Polymerase) estava clivada tanto nas células aderidas quanto nas flutuantes (soltas no meio de cultura). Apesar de apresentar alta homologia com a BaP1, a Insularinase A não foi capaz de causar desgrudamento nem apoptose em HUVECs (MODESTO *et al.*, 2005).

Embora os efeitos das enzimas rACLF e rACLH sobre a viabilidade das células tenham sido semelhantes, as atividades enzimáticas das enzimas sobre os substratos testados foram diferentes. Foi demonstrado que a eficiência enzimática da rACLF sobre o substrato sintético correspondente a cadeia central da insulina é maior do que a rACLH. Além disso, quando incubadas com a pró-insulina recombinante também foi observada diferença nos produtos de hidrólise do substrato. Apesar da alta similaridade entre as enzimas estudadas, algumas diferenças estruturais podem interferir na hidrólise dos substratos testados.

As diferentes respostas celulares ao tratamento com rACLF podem ser devido ao efeito direto da enzima sobre receptores celulares, induzindo à fatores que potencializem a viabilidade celular ou a enzima poderia estar atuando em proteínas da matriz extracelular gerando fragmentos com atividade biológica. Como evidenciado neste trabalho, a rACLF pode ser utilizada para elucidar mecanismos de desgrudamento e morte celular em linhagens celulares tumorais ou até mesmo na tumorigênese *in vivo*, avaliando-se a ação da enzima no crescimento tumoral.

Se por um lado, as SVMs, baseadas nas suas propriedades bioquímicas potencializam os efeitos sistêmicos nos envenenamentos, por outro lado são excelentes ferramentas para a investigação de mecanismos moleculares e celulares, assim como para aplicações farmacêuticas.

A ausência da atividade hemorrágica associada ao efeito citotóxico em células tumorais, potencializam a rACLF como ferramenta para estudos terapêuticos, como por exemplo, desenvolvimento de compostos antitumorais e para o tratamento de trombose.

6. Conclusões e perspectivas

Neste trabalho demonstrou-se que a rACLF apresenta efeito direto sobre HUVECs, aumentando a expressão de moléculas envolvidas na quimiotaxia, regulação do tônus vascular e inflamação. Além disso, foi observado que a enzima atua sobre a sobrevivência celular, evitando a morte das células quando incubada tanto com HUVECs quanto com fibroblastos.

A rACLF não apresentou efeito citotóxico sobre fibroblastos humanos nem sobre a linhagem tumoral MB-MDA-231. A análise dos meios condicionados de fibroblastos tratados com a enzima revelou que a rACLF modula a expressão de quimiocinas CXC (IL-8 e GRO) e CC(MCP-1). Porém, não teve efeito na expressão de MMPs.

Quando incubada com células tumorais HeLa e MCF-7, a rACLF diminuiu significativamente a viabilidade das células, além de induzir alterações na morfologia e causar desgrudamento de células HeLa. Efeito semelhante foi observado quando as células foram incubadas com rACLH (outra metalopeptidase de *A. contortrix lacticinctus*).

Com respeito à atividade proteolítica, mostrou-se que a rACLF hidrolisa proteínas da matriz extracelular, tais como fibronectina, laminina, colágeno IV e trombospondina. Comparando-se as atividades da rACLF e da rACLH, demonstrou-se que a rACLF é mais eficiente na degradação do peptídeo correspondente à cadeia central da insulina. Já a hidrólise da pró-insulina por estas enzimas gerou produtos com massas moleculares distintas, o que indica diferença na atividade.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que a rACLF apresentou efeito citotóxico somente para as linhagens tumorais HeLa e MCF-7. Por outro lado, quando incubada com HUVECs e fibroblastos, a enzima atuou como fator de

sobreviência e induziu a liberação e expressão de moléculas envolvidas em diferentes processos celulares. Estes resultados abrem perspectivas para novos estudos visando à elucidação das vias de sinalização responsáveis pelos efeitos específicos sobre as diferentes linhagens celulares.

7. Referências Bibliográficas

- ABBAS A. K. *et al.* Cellular and molecular immunology 3 ed Philadelphia: W B Saunders, 1997.
- ADAMS, D .H.; LOYD, A. R. Chemokines: leukocyte recruitment and activation cytokines. **Lancet**, v. 349, p. 490-495, 1997.
- AOUDJIT F.; VUORI, K. Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-Flip and implications for anoikis. **J. Cell Bio**, v. 152, p. 633-643, 2001.
- ARAKI, S. *et al.* Involvement of specific integrins in apoptosis induced by vascular apoptosis-inducing protein 1. **Toxicon**, v. 40, p. 535-542, 2002.
- AUMAILLEY, M.; GAYRAUD, B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. **J. Mol. Med.**, v. 76, p. 253-265, 1998.
- AUMAILLEY, M., KRIEG, T. Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes. **J. Invest. Dermatol.** v.106, n. 2 p.209-214, 1996.
- BAGGIOLINI, M. *et al.* Human chemokines: an update. **Annu. Rev. Immunol** v. 15, p 675-705, 1997.
- BALEVIQUA M. P. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. **Annu. Rev. Immunol.** v.11, p.767-804, 1993.
- BARAMOVA, E. N. *et al.* Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 275, p. 63-71, 1989.
- BELPERIO, J. A. *et al.* CXC chemokines in angiogenesis. **J. Leukoc. Biol.** v. 68, p.1-8, 2000.
- BERLIN, C. *et al.* Alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. **Cell**, v. 80, p. 413, 1995.
- BEWSEY, K. E. *et al.* Fibronectin fragments induce the expression of stromelysin -1 mRNA and protein in bovine chondrocytes monolayer cultures. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1317, p. 55-64, 1996
- BIRKEDAL-HANSEN, Proteolytic remodeling od extracellular matrix. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 7, p. 728-735, 1995.
- BJARNASON, J. B. N.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venom. **Pharmac. Ther.**, v. 62, p. 325-372, 1994.
- BODE, W.; GOMIS-RUTH, F.X.; STOCKER, W. Astacyn, serralysin, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a comom family the 'metzincins'. **FEBS Lett.** v. 31, p. 134-140, 1993.

BORISH, L.C.; STEINKE J.W. Cytokines and chemokines. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.111, n. 2, p. S460-S475, 2003.

BORNSTEIN P. Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. **J. Clin. Invest.**, v.107, p. 929-934, 2001.

BOUDREAU, N.; BISSELL, M. J. Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. **Curr. Opin. Cell. Biol.** v.10 p. 640-646, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.8. **Anal. Biochem.**, v.72, p. 248-254, 1976.

BROWN, J. C.; TIMPL, R. The collagen superfamily. **Int. Arch. Allergy Immunol.** v. 107, n. 4 p. 484-90, 1995.

BRYANT, R. W.; GRANZOW, C.A, SIEGEL MI, EGAN RW, BILLAH MM. Phorbol esters increase synthesis of decay-accelerating factor, a phosphatidylinositol-anchored surface protein, in human endothelial cells. **J. Immunol.** v. 144 p. 593-598, 1990.

BURGESSON, R. E. Type VII collagen, anchoring fibrils, and epidermolysis bullosa. **J Invest Dermatol.**, v. 101, n. 3, p. 252-255, 1993.

BURGOYNE, R.D.; MORGAN, A. Secretory granule exocytosis. **Physiol. Rev.**, v. 83, p. 581-632, 2003.

CASTLE, V.P.; DIXT, V. M.; POLVERINI, P. J. Thrombospondin-1 suppress tumorigenesis and angiogenesis in serum - and anchorage-independent NIH3T3 cells. **Lab. Invest.**, v.77, p. 51-61, 1997.

CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends in Cell Biol.**, v.11, p. 37-43, 2001.

CHEN H, HERNDON ME, LAWER J. The cell biology of Thrombospondin-1. **Matrix Biol**, v.19 p. 597-614, 2000.

CHEN, R. Q., *et al.* A new protein structure of P-II class snake venom metalloproteinase: it comprises metalloproteinase and disintegrin domains. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 310, p. 182-187, 2003.

CINES, D. B. *et al.* Endothelial cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorder. **Blood**, v. 91, p. 3527-3561, 1998.

COLOGNATO H.; YURCHENCO P.D. Form and function: the laminin family of heterotrimers. **Dev. Dyn.**, v. 218, n. 2, p. 213-234, 2000.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. **Chem. Biol.**, v. 3 p. 895-904, 1996.

CURRAN, S.; MURRAY, G. I. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in the invasion and metastasis. **Eur. J. Cancer**, v. 36 p. 1621-1630, 2000.

DATTA, G. *et al.*. Biochemical characterization of basilase, a fibrinolytic enzyme from *Crotalus basiliscus basiliscus*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 13, p 365-373, 1995.

DAVIS, G. E. *et al.* Regulation of tissues injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. **Am. J. Pathol.**, v. 156, p.1489-1498, 2000.

DE ARCANGELIS A. *et al.* Inhibition of laminin alpha 1-chain expression leads to alteration of basement membrane assembly and cell differentiation. **J. Cell Biol.**, v. 133, p. 417-430, 1996.

DECLERCK, Y. A. Interaction between tumor cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinase in cancer. **Eur. J. Cancer** v. 36 p. 1258-1268, 2000.

DIAZ, C. *et al.*. Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on endothelial cells. **J. Cell Biochem.**, v. 94, p. 520-528, 2005.

FARSKY, W,*et al.*. Bothrops asper snake venom and its metalloproteinase BaP1 activate the complement system. Role in Leukocyte recruitment. **Mediators Inflamm.**, v. 9, p. 213-221, 2000.

FRASER, J. R.; LAURENT, T. C.; LAURENT, U. B. Hyaluronan: its nature, distribution, function and turnover. **J. Intern. Med.**, v. 242, p. 27-33,1997.

FRANCESCHI, A. *et al.* Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 38, p. 63-77, 2000.

FRIES, W. Collagen-biomaterial for drug delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 45, p. 113-136, 1998.

FRISCH S .M.; SCREATON R. A. Anoikis mechanisms. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 13, p. 555-562, 2001.

FRITZEN M. **Modulação de respostas de células endoteliais (HUVECs) induzidas por proteases fibrinogenilíticas e ativadores da coagulação, obtidos de venenos de animais.** 2005. Tese (Doutorado em Biologia Molecular). Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2005.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, p. 969-985, 2005.

FOXMAN, E. F. *et al.* Multistep navigation and combinatorial control of leukocyte chemotaxis. **J. Cell Biol.**, v. 139, p. 1349-1360, 1997.

GALLAGHER P. *et al.* Role of the snake venom toxin jararhagin in proinflammatory pathogenesis: In vitro and in vivo gene expression analysis of the effects of the toxin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 441, n.1, p. 1-15, 2005.

- GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 225–260, 1998.
- GIANCOTTI, F. G. Complexity and specificity of integrin signaling. **Nat. Cell Biol.**, v. 2, p. E13-E14, 2000.
- GIANCOTTI, F. G.; RUOSLATHI, E. Integrin signaling. **Science**, 285: 1028-1032, 1999
- GOLD, B. S.; DART, R. C.; BARISH, R. A. Bites by venomous snakes. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, p. 347-356, 2002.
- GOMES-RÜTH, F. X. Structural aspects of the metzincins clan of metalloendopeptidases. **Mol. Biotechnol.**, v. 24, p 157-165, 2003.
- GROSSMAN, J. Molecular mechanisms of ‘detachment-induced apoptosis-Anoikis’. **Apoptosis** v. 7, p. 247-260, 2002.
- GUPTA, K. *et al.* Binding and displacement of vascular endothelial growth factor (VEGF) by thrombospondin: effect on human microvascular endothelial cell proliferation. **Angiogenesis**, v. 147, p. 1947-1930, 1999.
- GUTIERREZ, J. M.; RUVAVADO, A. Snake venos metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841-850, 2000.
- HAIL JR, N. *et al.* Apoptosis effector mechanisms: A réquiem performed in different keys. **Apoptosis**, v. 13, 2006. *in press*.
- HARKNESS, K. A. *et al.* Cytokine regulation of MCP-1 expression in brain and retinal microvascular endothelial cells. **J. Neuroimmunol.**, v. 142, n. 1-2, p. 1-9, 2003.
- HITE, L.A. *et al.* cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: srtructure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 308, p. 182-191, 1994.
- HO, P. L. *et al.* Angiostatin-like molecules are generated by snake venom metalloproteinases.. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 294, p. 879-885, 2002.
- HOOPER, N.M. Family of zinc metalloproteinases. **FASEB Lett.**, v. 354, p.1-6, 1994
- HULBOY, D. L.; RUDOLPH, L. A.; MATRISIAM, L. M. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 3, p. 27-45, 1997.
- INOUE, K.; SLATON, J. W., KIM, S. J. Interleukin-8 Expression Regulates Tumorigenicity and Metastasis in Human Bladder Cancer. **Cancer Res.**, v. 60, p 2290-2299, 2000.
- IOZZO, R.V.; SAN ANTONIO J. D. Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. **J. Clin. Invest.**, v.108, p. 349-355, 2001.

JAFFE, E. A. *et al.* Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphological and immunologic criteria. **J. Clin. Invest.**, v. 52, p 2745-2756, 1973.

JIA, L. G. Function of disintegrin-like/cystein rich domains of atrolysin A. **J. Biol. Chem.**, v. 272 p. 13094-13102, 1997.

JIA, L.G. Snake venoms metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family proteins. **Toxicon**, v. 34, p. 1269-1276, 1996.

JOHNSON, E. K.; OWNBY, C. L. Isolation of a hemorrhagic toxin from the venom of *Agkistrodon contortrix laticinctus* (Broad-banded copperhead) and pathogenesis of the hemorrhage induced by the toxin in mice. **Int. J. Biochem.** v.25, p. 267-278, 1993.

KAPILA, Y. L.; KAPILA, S.; JOHNSON, W. fibronectin and fibronectin fragments modulate the expression of proteinases and proteinases inhibitors expression in human periodontal ligament cells. **Matrix Biol.** v. 15, p. 251-261, 1996.

KAPLANSKI G. *et al.* IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends Immunol.**, v. 24, p. 25-29, 2003.

KIECHLE, F. L; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clin. Chim. Acta**, v. 326, p. 27-45, 2002.

KIM, S. *et al.* Regulation of angiogenesis *in vivo* by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin. **Am J. Pathol.**, v 156, p 1345-1362, 2000.

KUNKEL *et al.* Chemokines and their role in human disease. **Agents Action**, v. 46, p.11, 1995. (suppl).

KUSANO, K. *et al.* Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2,-3,-9 and-13) by Interleukin-1 and Interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. **Endocrinol.**, v. 139, p. 1338-1345, 1998.

LAUER-FILDS, J. L.; JUSKA, D.; FILDS, G. Matrix Metalloproteinases and Collagen Catabolism. **Biopolymers (Peptide Science)**, v 66, p. 19-32, 2002.

LAWEL, J. The functions of thrombospondin-1 and-2. **Curr Opin Cell Biol** v.12, p. 634-640, 2000.

LENARDO, M. *et al.* Mature lymphocyte apoptosis-immune regulation in dynamic and unpredictable antigenic environment. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 221-223, 1999.

LI, A. *et al.* IL-8 **Directly** Enhanced Endothelial Cell Survival, Proliferation, and Matrix Metalloproteinases Production and Regulated Angiogenesis. **J. Immunol.**, p. 3369-3376, 2003.

LINARD, C. *et al.* Acute induction of inflammatory cytokine expression after γ – irradiation in the rat: effect of an NF-kB inhibitor. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.** 58, n.2, 427–434, 2004.

LUBLIN, D.M; ATKINSON, J. P. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. **Annu. Rev. Immunol.**, v.7, p 35-58, 1989.

LUCA, M. *et al.*. Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. **Am. J. Pathol.**, v. 151, p. 1105-1113, 1997.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, p. 1749-1800, 1998.

MASUDA, S. *et al.*. Purification, cDNA cloning and characterization of the vascular apoptosis-inducing protein HV1, from *Trimeresurus flavoviridis*. **Eur. J. Biochem.**, 2001.

MASUDA, S.; HAYASHI, H.; ARAKI, S. Two vascular apoptosis-inducing proteins from snake are members of the metalloproteinase/desintegrin family. **Eur. J. Biochem.**, v. 253 n. 1, p. 36-41, 1998.

MASUDA, S. *et al.* cDNA cloning and characterization of vascular apoptosis-inducing protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 278 n. 1, p. 197-204, 2000.

MAUVIEL, A. *et al.* Leukoregulin down-regulates type I collagen mRNA levels and promoter activity in human dermal fibroblasts, and counteracts the up-regulation elicited by transforming growth factor-beta **J. Cell. Biochem.**, v. 50, p. 53-61, 1992.

McQUIBBAN A. *et al.* Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC Chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. **Blood**, v. 100, p. 1160-1166, 2002.

MEREDITH, J. E.; FAZELI, B.; SCHWARTZ, M. A. The extracellular matrix as a survival factor. **Mol. Biol. Cell.**, v. 4, p. 953-960, 1993.

MIDDLETON, J. *et al.* Leukocyte extravasion: chemokine transport and presentation by endothelium. **Blood**, v.100, p. 3853-3860, 2002.

MIWA, T.; SONG, W. C. Membrane complement regulatory proteins: insight from animal studies and relevance to human diseases. **Int. Immunopharmacol.**, p.445-459. 2001.

MODESTO, J. C. A. *et al.* Insularinase A, a prothrombin activator from Bothrops insularis venom, is a metalloproteinase derived from a gene encoding protease and disintegrin domains. **Biol. Chem.**, v. 386, p. 589-600, 2005.

MOORE, B. B.; ARENBERG, D. A.; ADDISON, C. L. Tumor angiogenesis is regulated by chemokines. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 132 p. 97-103, 1998.

MOURA-DA-SILVA, A. M. *et al.*. Processing of pro-tumor necrosis factor by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, p. 2000-2005, 1996.

MOUTABARRIK, A. *et al.*. Cytokine-mediated regulation of the surface expression of complement regulatory proteins CD46(MCP), CD55(DAF), and CD59 on human vascular endothelial cells. **Lymphokine Cytokine Res.**, v. 12, p.167-72, 1993.

NGUYEN, M.; ARKELL, J.; JACKSON, C. J. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 33 p. 960-970, 2001.

NIKAI, T. *et al.* Primary structure and functional characterization of bilitoxin-1 a novel dimeric PII snake venom metalloproteinase from *Agkistrodon bilineatus* venom. **Biochem. Biophys.**, v. 378, p. 6-15, 2000.

OH, S. P. *et al.* Isolation and sequencing of cDNA for proteins with multiple domains of Gly-Xaa-Yaa repeats identify a distinct family of collagenous proteins. **Proc Natl. Acad. Sci USA**, v. 91, p. 4229-4333, 1994.

O'REILLY, M. *et al.* Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell**, v. 88, p. 277-285, 1997.

OWNBY, C. L. Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. In SHIER, W. T., MEBS, D. (Ed). **Handbook in toxinology**. New York, Marcel Dekker, 1990, p.601-654.

PATARROYO, M.; TRYGGVASON, K.; VIRTANSEN, I. Laminin Isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. **Seminars Cancer Biol.**, v. 12. p 197-217, 2000.

PLAXCO, K W. *et al.* Rapid refolding of a proline-rich all-beta-sheet fibronectin type III module. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93 n. 20, p.10703-6, 1996.

POTTS JR, CAMPBELL ID. Fibronectin structure and assembly. **Curr Opin Cell Bio** 6: 648, 1994.

RAMOS O. H. P.; SELISTRE- DE- ARAUJO H. S. Comparative analysis of the catalytic domain of hemorrhagic and non-hemorrhagic snake venom metalloproteinases using bioinformatic tools. **Toxicon**, v. 44, p. 529-538, 2004.

RAMOS, O. H. P.; CARMONA, A.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Expression, refolding and in vitro activation of a recombinant snake venom pro-metalloproteinase. **Prot. Exp. Purif.**, v. 28, p. 34-41, 2003.

REED, M.J. *et al.* Expression of Thrombospondin by endothelial cells. Injury is correlated with TSP-1. **Am. J. Pathol.**, 147, 1068-1080, 1995.

ROLLINS, B.J. Chemokines. **Blood**, v. 90, p. 909-928, 1997.

ROEBUCK, K. A. Regulation of interleukin-8 expression. **J Interferon and Cytokine Res.**, v.19, p.429-438, 1999.

RUCAVADO A. *et al.* **Mediators Inflamm.**, v. 26, p.13-17, 2002.

RUCAVADO, A. *et al.* Characterization of the local tissue damage induced by LHF II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom **Toxicon**, v. 37 p. 1297-1312, 1999.

RUCAVADO, A. *et al.* Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Int. J. Exp. Pathol.** v.63, p. 186-199, 1995.

RUGGERI, Z.M., WARE, J. von Willebrand factor. **FASEB J.** v.7, n.2, p.308-16, 1993.

SARAIVA-OTEN P., FRISAN T., THELESTAM *et al.*. Membrane independent activation of fibroblast proMMP-2 by snake venom: a novel roles for venom proteinases. **Toxicon** v.44, p 749-764, 2004.

SCHATTNER M., FRITZEN M., VENTURA J.S. *et al.*. The sanke venom metalloproteinases berythracivase and jararhagin activate endothelial cells. **Biol Chem.** v. 386, p. 369-374, 2005.

SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S., OWNBY, C. L. Molecular cloning and sequences analysis of cDNAs for metalloproteinases from *Agkistrodon contortrix laticinctus*. **Arch. Biochem. Biophys.** v.320, p. 141-148, 1995

SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S., SOUZA, D. H. F., OWNBY, C. L. (1997). **Biochem. Biophys. Acta**, 1342(2): 109-115.

SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. e OWNBY, C.L. Molecular cloning and sequence analysis of cDNAs for metalloproteinases from Broad-banded copperhead, *Agkistrodon contortrix laticinctus*. **Arch. Biochem. Biophys.** v.320,p. 141-148, 1995

SHAPIRO, S. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. **Curr. Opin. Cell Biol.** v.10 p. 602-608, 1998

SHIBATA T, COSIO FG, BIRMINGHAM DJ. Complement activation induces the expression of decay-accelerating factor on human mesangial cells. **J Immunol** 1991;147:3901-8.

SIIGUR J., SAMEL M., TONISMAGI K. *et al.*. Biochemical characterization of lebetase, a direct-acting fibrinolytic enzyme from *Vipera lebetina* snake venom. **Thromb. Res.** v. 90, p. 39-49, 1998.

SILVA M. B., SCHATTNER M., RAMOS C., *et al.*. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* snake venom: characterization and molecular cloning. **Biochem J.** v. 369, p. 129-139, 2003.

STEFENEC T. Endothelial apoptosis: Could it have a role in the pathogenesis and treatment disease? **Chest** v 117, p. 841-854, 2000

STERNLICHT MD, WERB Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behaviour. **Ann. Rev. Cell Dev.** v. 17, p. 463-516, 2001

STORGARD C.M., STUPACK A., JONCZYK S.L. *et al.*. Decreased angiogenesis and artheitic disease in rabbits treated with an alphaVbeta3 antagonist. **J. Clin Invest.** v. 103, p. 47-54, 1999.

STREULI C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. **Curr. Opin. Cell Biol.** v. 11. p 634-640, 1999.

STRIETER R. M., BURDICK M. D., GOMPERS B. N. *et al.*. CXC chemokines in angiogenesis. **Cytokine & Growth Factor** v. 16, p. 593-609, 2005

STUPACK D. G., PUENTES X. S., BOUTSABOUALOY S *et al.*. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins, **J. Cell Biol.** v 155 (3), p. 459-470, 2001

TAIPALE J, KESKI-OJA J. Growth factors in the extracellular matrix. **FASEB J.** () 11, 51-59. 1997

TANG C-H., YANG R-S., LIU, C-Z *et al.*. Differential susceptibility of osteosarcoma and primary osteoblasts to cell detachment caused by snake venom metalloproteinase protein. **Toxicon** v 43, p. 11-20, 2004.

TARABOLETTI G, BELOTTI D, BORSOTTI P, *et al.*. The 140-kilodalton antiangiogenic fragment of thrombospondin-1 binds to basic fibroblast growth factor. **Cell Growth Differ.** 8:471-479, 1997.

TARABOLETTI G, MORBIDELLI L, DONNINI S, *et al.*. The heparin binding 25 kDa fragment of TSP-1 promotes angiogenesis and modulates gelatinase and TIMP-2 production in endothelial cells. **FASEB J.** 14: 1674-1678, 2000.

TARABOLETTI G, ROBERTS D, LIOTTA LA, GIAVAZZI R. Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor. **J Cell Biol.** 1990, 111: 765-772.

TAYLOR K. R., GALLO R. L. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. **FASEB J.** v. 20, p. 9-18, 2006.

TEIXEIRA MM *et al.*. Chemokine-induced eosinophil recruitment. Evidence of a role for endogenous eotaxin. **J Clin Invest** v. 100, p. 1657, 1997

TERADA S., HORI J., FUJIMURA S. *et al.*. Purification and amino acid sequence of brevilysin L6, a non-hemorrhagic metalloproteinase from *Agkistrodon halys brevicaudus* venom. **J. Biochem.** v. 125, p. 64-69, 1999.

TIMPL R, BROWN JC Supramolecular assembly of basement membranes. **Bioassays.** v. 18(2) p. 123-32, 1996

TSUJI S, KAJI K, NAGASAWA S. Decay-accelerating factor on human umbilical vein endothelial cells. Its histamine-induced expression and spontaneous rapid shedding from the cell surface. **J Immunol** v.152:1404-1410, 1994.

UBRICHT H., ERIKSON E.E., LINDBOM L. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. **Trends Pharmacol. Sci** v. 24, p. 640-647, 2003.

VAN DER REST , M, GARRONE , R. Collagen family of proteins. **The FASEB J.** v. 5, p. 2816-2823, 1991.

VINCE G.H., WAGNER S., PIETSCH T. *et al.*. Heterogeneous regional expression patterns of matrix metalloproteinases in human malignant gliomas. **Int J Dev Neurosci.** v.17(5-6) p. 437-45, 1999.

VU T.H., WERB Z. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. **Mol Med Today** v. 14, p.2113-2133, 2000.

WALPORT M.J. Complement. Second of two parts. **N Engl J Med** v. 344, p.1140-1144.

WEIMASTER, G. Reprolysins and astacins...alive, alive-o. **Science** v. 279, p 336-337, 1998.

WERB Z. ECM and cell surface proteolysis: Regulating cellular ecology. **Cell** v. 91, p. 439-442. 1997.

WIESSEN J, WERB Z., Proteinases, cell cycle regulation, and apoptosis during mammary gland involution. **Mol Reprod Dev** v 56(4) p 534-540, 2000.

WU W.B., HUANG T.F. Activation of MMP-2 cleavage of matrix proteins, and adherens junctions during a snake venom metalloproteinase-induced endothelial cell apoptosis. **Exp Cell Res** v. **288**, p. 143-157, 2003.

YE, S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. **Matrix Biol.** v.19(7) p.623-629, 2000.

YOU W.K., SEO H.J., CHUNG K.H., KIM D.S. A novel metalloprotease from *Gloydius halys* venom induces endothelial cell apoptosis through its protease and disintegrin-like domain. **J. Biochem.** v. 134, p. 739-749, 2003.

ZAKCRI Z. BURSH W., TENNISWOOD M *et al.*. Cell death: Programmed, apoptosis, necrosis or other? **Cell Death Differentiation** v. 2, p 294-297, 1995

ZHOU Q., SMITH J.B., GROSSMAN M.H. Molecular cloning and expression of catrocollastatin, a snake-venom protein from *Crotalus atrox* (western diamondblack rattlesnake) wich inhibits platelet adhesion to collagen. **J. Biochem** 307 (2), 411-417, 1995.