



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

EFEITOS DE UMA DESINTEGRINA RGD RECOMBINANTE DE *Rhinocerophis alternatus* (*Bothrops alternatus*) NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS NORMAIS E TUMORAIS

CYNTIA DE FREITAS MONTENEGRO

SÃO CARLOS – SP

2011

EFEITOS DE UMA DESINTEGRINA RGD RECOMBINANTE DE *Rhinocerophis alternatus* (*Bothrops alternatus*) NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS NORMAIS E TUMORAIS

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

**EFEITOS DE UMA DESINTEGRINA RGD RECOMBINANTE DE *Rhinocerophis alternatus* (*Bothrops alternatus*) NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS NORMAIS E TUMORAIS**

**CYNTIA DE FREITAS MONTENEGRO**

Dissertação apresentada ao programa Interinstitucional 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 a obtenção de título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**SÃO CARLOS – SP**

**2011**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar

M777ed Montenegro, Cyntia de Freitas.  
Efeitos de uma desintegrina RGD recombinante de  
*Rhinocerothis alternatus* (*Bothrops alternatus*) na migração  
de células normais e tumorais / Cyntia de Freitas  
Montenegro. -- São Carlos : UFSCar, 2012.  
69 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2011.

1. Câncer. 2. Células - migração. 3. DisBa-01. 4.  
Desintegrina. 5. *Rhinocerothis alternatus*. 6. Metástase. I.  
Título.

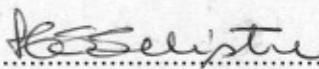
CDD: 616.994 (20<sup>a</sup>)

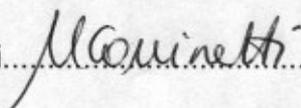
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

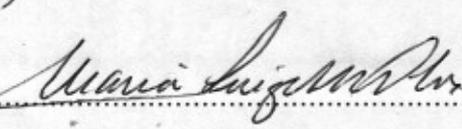
Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Cyntia de Freitas Montenegro

Dia 03/08/2011

Profª. Drª. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo ..... 

Profª. Drª. Márcia Regina Cominetti ..... 

Profª. Drª. Maria Luiza Vilela Oliva ..... 

Dedico este trabalho aos meus pais Fátima e  
Tácito e a minha irmã Cybele, pelo  
incentivo e apoio irrestrito, sempre!

## AGRADECIMENTOS

Em especial à minha família pelo apoio incondicional, em todos os momentos! E a todos os outros membros da família tios, tias, primas, primos e Vô e Vós!

Agradeço imensamente à Helo, primeiramente por ter me aceitado de braços abertos, sem nenhuma experiência e pelo apoio durante esses anos. Aprendi muito e espero continuar aprendendo.

À todas as meninas do laboratório, mas em especial à Carmen que me “iniciou” nos estudos sobre a DisBa-01. À Carol que foi, praticamente, uma co-orientadora, me ensinou tudo e mais um pouco sobre cultura celular, e que fora do laboratório se tornou uma parceira e tanto para as horas de descontração! Adooooorooo! À Lívia (Broa!), muito obrigado por tudo, pela amizade, pelas boas conversas e companhia nos momentos bons e difíceis. E à todas as meninas, Kelly (né menininha?!), Paty, Araceli, Uliana, Rita, Fernanda, Aninha (IC), Verônica, Silvia (Japa), Natália (técnica), Dani, Patricia, Rafa, Grazi, Bete, Camila, Juliana e aos meninos Guilherme (Sazon), Zé Roberto e Vinícius.

À Heline, colega na faculdade em Fortaleza e com quem, por acaso, vim a morar! Obrigada pelas boas conversas, incentivos, aprendizado e pela convivência super tranquila nesses últimos dois anos e meio. Vai deixar saudades viu...ou não ne?!

Ao Eurípedes, namorado super demais, por todo o apoio, ajuda e paciência. Te Adoroo!

À todos os meninos que nos cercam dos laboratórios vizinhos. Tio Charles e Léo em especial.

Aos meninos da USP, David, Pablo, Tácito, Pimpas e todos os outros pelos momentos de descontração!

Às amigas queridas de Fortaleza de Fortaleza, Ju, Laris, Mariana, Day, Danielle, Lara, Alba, morro de saudade de vocês!

Ao CNPQ, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Uma série de processos celulares está envolvida na metástase, entre eles a migração e invasão celular dos tecidos vizinhos, vasos sanguíneos e proliferação. Esses eventos são mediados por integrinas, receptores de adesão, presentes nas superfícies celulares, responsáveis pela ligação das células com a matriz extracelular. As desintegrinas, polipeptídeos provenientes de venenos de serpentes, são conhecidos por inibir a ação das integrinas e, conseqüentemente, eventos como a migração, que ocorrem durante a metástase. Possuem ainda, influência sobre a atividade das metalopeptidases (MMPs), enzimas que clivam a MEC facilitando a invasão das células tumorais. A DisBa-01 é uma desintegrina recombinante que possui motivo RGD e é proveniente do veneno da *Rhinocerophis alternatus* (*Bothrops alternatus*). Estudos anteriores comprovaram sua alta afinidade pela integrina  $\alpha v \beta 3$  e atividade anti-metastática *in vivo*. Portanto, o objetivo desse estudo foi investigar a ação da DisBa-01 sobre a migração e atividade das MMPs de fibroblastos e das linhagens de câncer de mama, MDA-MB-231, próstata, DU-145 e melanoma murino, B16F10. Foram realizados ensaios de migração em *transwell*, *wound healing*, e zimografia em gel de poliacrilamida acrescido de gelatina utilizando a DisBa-01 nas concentrações de 10, 100, 500 e 1000nM. A inibição da migração em *transwell* foi significativa nos fibroblastos, MDA-MB-231 e DU-145, porém não houve efeito sobre a linhagem B16F10, que teve como quimioatraente o meio condicionado de fibroblastos. Nos ensaios de *wound healing* apenas a concentração de 1000 nM da DU-145 foi inibida de forma significativa. Finalmente, a zimografia foi realizada utilizando meio condicionado de ensaios *wound healing* para analisar a presença das MMPs 2 e 9. Nos fibroblastos e B16F10 a atividade da MMP-2 e as MMPs 2 e 9 foram inibidas respectivamente. Enquanto a linhagem MDA-MB-231 teve a secreção da MMP-9 estimulada, em todas as concentrações, de forma significativa. Tendo em vista os resultados, a DisBa-01 pode ser utilizada na construção de modelos para o desenho racional de possíveis fármacos que atuem na terapia anti-metastática, além da sua utilização como instrumento de pesquisa para elucidação de mecanismos relacionados as integrinas.

## ABSTRACT

Cell migration, invasion of the surrounding tissues, blood vessels and proliferation are cellular processes involved in metastases. These events are mediated by integrins, adhesion receptors present on cell surfaces and responsible for the extracellular matrix and cells binding. Disintegrins, snake venoms polypeptides, are known to inhibit integrins action, and thus metastatic events such as cell migration. They also have influence on metalloproteinases activity, enzymes that cleave ECM components facilitating tumor cells invasion. DisBa-01 is a recombinant RGD disintegrin from *Rhinoceros alternatus* (*Bothrops alternatus*) venom gland. In previous studies we have demonstrated that DisBa-01 binds to  $\alpha v \beta 3$  integrin with high affinity and has an anti-metastatic activity. Therefore the aim of this study was to investigate the effect of DisBa-01 on migration and MMPs activities in fibroblasts and cell lines of breast cancer, MDA-MB-231, prostate, DU-145 and murine melanoma, B16F10. Transwell migration tests, wound healing and gelatin gel zymography were performed using DisBa-01 at concentrations of 10, 100, 500 and 1000 nM. Transwell migration was significantly inhibited in fibroblasts, MDA-MB-231 and DU-145 but had no effect on B16F10 cells, which had fibroblast conditioned medium as chemoattractant. In wound healing assays only DU-145 migration in a 1000nM concentration was significantly inhibited. Finally, zymography was performed using wound healing assay conditioned medium to analyze the presence of MMPs 2 and 9. In fibroblasts and B16F10 cells MMP-2 and MMPs 2 and 9 were decreased respectively. On the other hand, MDA-MB-231 cells showed increased MMP-9 activity, in all concentrations tested. Given the results, DisBa-01 can be used to build models for possible drugs rational design that may act in anti-metastatic therapy, in addition to its use as a research tool to elucidate integrins related mechanisms.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. O MICROAMBIENTE PRESENTE NO TUMOR PRIMÁRIO.....	2
FIGURA 2. COLONIZAÇÃO DO SÍTIO METASTÁTICO. ....	5
FIGURA 3. TIPOS DE MIGRAÇÃO. ....	7
FIGURA 4. VISÃO LATERAL DE UMA CÉLULA MIGRANDO. ....	8
FIGURA 5. TRANSCRIPTOMA DO VENENO DA <i>RINOCEROPHIS ALTERNATUS</i> . ....	14
FIGURA 6. CLASSES DE SVMPS.....	15
FIGURA 7. COMPARAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA DISBa-01 COM DIFERENTES DESINTEGRINAS. ....	18
FIGURA 8. REVELAÇÃO DE ENSAIO DE MIGRAÇÃO TRANSWELL. ....	23
FIGURA 9. REALIZAÇÃO DO ENSAIO DE <i>WOUND HEALING</i> . ....	24
FIGURA 10. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA DISBa-01 EM GEL DE SDS-PAGE (15%). ...	27
FIGURA 11. INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE FIBROBLASTOS HUMANOS PELA DISBa-01. ....	28
FIGURA 12. MIGRAÇÃO DE CÉLULAS MDA-MB-231 PELA AÇÃO DA DISBa-01. ....	29
FIGURA 13. INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DU-145 PELA AÇÃO DA DISBa-01. ....	30
FIGURA 14. EFEITO DA DISBa-01 NA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS B16F10.....	31
FIGURA 15. EFEIO DA DISBa-01 NA LINHAGEM DE FIBROBLASTOS HUMANOS NO <i>WOUND HEALING</i> . ....	32
FIGURA 16. <i>WOUND HEALING</i> EM FIBROBLASTOS. ....	33
FIGURA 17. EFEITO DA DISBa-01 EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA NO TEMPO DE 0-24HS EM ENSAIO DE <i>WOUND HEALING</i> . ....	34
FIGURA 18. <i>WOUND HEALING</i> NA LINHAGEM MDA-MB-231.....	35
FIGURA 19. INIBIÇÃO CAUSADA PELA DISBa-01 NO ENSAIO DE <i>WOUND HEALING</i> NO TEMPO DE 0- 24HS . ....	36
FIGURA 20. FOTOS DO ENSAIO DE <i>WOUND HEALING</i> NA LINHAGEM DU-145.....	37
FIGURA 21. EFEITO DA DISBa-01 SOBRE AS CÉLULAS B16F10 EM <i>WOUND HEALING</i> . ....	38
FIGURA 22. FOTOS DO ENSAIO DE <i>WOUND HEALING</i> COM A LINHAGEM MURINA B16F10. ....	39
FIGURA 23. ATIVIDADE DA PRÓMMP-2 EM FIBROBLASTOS.....	40
FIGURA 24. INIBIÇÃO DA DISBa-01 NA EXPRESSÃO DA PRÓMMP-2 EM MEIO CONDICIONADO DE FIBROBLASTOS EM GEL DE ZIMOGRÁFIA.....	41
FIGURA 25. ANÁLISE QUANTITATIVA DA MMP-9 DA MDA-MB-231. ....	42
FIGURA 26. EFEITO DA DISBa-01 SOBRE A EXPRESSÃO DA MMP-9 EM MEIO CONDICIONADO DA MDA-MB-231 EM GEL DE ZIMOGRÁFIA.....	43
FIGURA 27. ANÁLISE DA ATIVIDADE DA MMP-9 E PRÓMMP-2 DA LINHAGEM DU-145. ....	44
FIGURA 28. EFEITO DA DISBa-01 SOBRE EXPRESSÃO DAS PRÓMMPs 9 E 2 E DA MMP-9 ATIVA EM MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS DU-145. ....	45
FIGURA 29. ANÁLISE DA ATIVIDADE DAS MMP-9 E PRÓMMP-2 NAS CÉLULAS B16F10. ....	46
FIGURA 30. EFEITO DA EXPRESSÃO DA PRÓMMP-9 E 2 NO MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS B16F10 EM GEL DE ZIMOGRÁFIA. ....	47
FIGURA 31. ANÁLISE DA ZIMOGRÁFIA DAS CÉLULAS B16F10 NO ENSAIO <i>TRANSWELL</i> . ....	48
FIGURA 32. EFEITO DA DISBa-01 SOBRE A EXPRESSÃO DAS PRÓMPPs 2 E 1 E MMP-2 ATIVA NO MEIO COLETADO DO ENSAIO <i>TRANSWELL</i> DA B16F10. ....	49
FIGURA 33. PERFIL DE INTEGRINAS PRESENTES NA LINHAGEM DE FIBROBLASTOS HUMANOS. .....	51
FIGURA 34. PERFIL DE INTEGRINAS PRESENTES NA LINHAGEM MDA-MB-231. ....	52

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO DAS DESINTEGRINAS DE ACORDO COM O COMPRIMENTO DA CADEIA POLIPEPTÍDICA E PRESENÇA DE SUBUNIDADES. ....	17
TABELA 2. GEL DE POLIACRILAMIDA A 10% COM GELATINA PARA ZIMOGRÁFIA. ....	25
TABELA 3. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS. ....	56

## **MOTIVOS ADESIVOS DAS DESINTEGRINAS**

<b>ECD</b>	Ácido glutâmico - Cisteína - Ácido aspártico
<b>DCD</b>	Ácido aspártico - Cisteína - Ácido aspártico
<b>KTS</b>	Lisina - Treonina - Serina
<b>RTS</b>	Arginina - Treonina - Serina
<b>MVD</b>	Metionina - Valina - Ácido aspártico
<b>MLD</b>	Metionina - Leucina - Ácido aspártico
<b>KGD</b>	Lisina - Glicina - Ácido aspártico
<b>MGD</b>	Metionina - Glicina - Ácido aspártico
<b>VGD</b>	Valina - Glicina - Ácido aspártico
<b>WGD</b>	Triptofano - Glicina - Ácido aspártico
<b>RGD</b>	Arginina - Glicina - Ácido aspártico

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADAMs</b>	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
<b>ADP</b>	Adenosina Difosfato
<b>BCA</b>	<i>Bicinchoninic Acid</i>
<b>BCE</b>	<i>Bovine Capillary Endothelial</i>
<b>bFGF</b>	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin</i>
<b>CAMs</b>	<i>Chicken Chorioallantoic Membrane</i>
<b>cDNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico complementar
<b>CRISP</b>	Proteína Secretora Rica em Cisteína
<b>DisBa-01</b>	Desintegrina de <i>Bothrops alternatus</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>ECA</b>	Enzima Conversora de Angiotensina
<b>EGF</b>	<i>Epithelial Growth Factor</i>
<b>EMT</b>	<i>Epithelial Mesenchymal Transition</i>
<b>FACs</b>	Fibroblastos Associados a Carcinomas
<b>FAK</b>	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
<b>FBS</b>	<i>Fetal Bovine Serum</i>
<b>FGF</b>	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
<b>FGFR</b>	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
<b>Grb7</b>	<i>Growth factor receptor-bound protein 7</i>
<b>GTP</b>	Guanosina Trifosfato
<b>HGF</b>	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
<b>HIF-1</b>	<i>Hypoxia Inducing Factor-1</i>
<b>HMEC-1</b>	<i>Human Microvascular Endothelial Cell</i>
<b>HUVECs</b>	<i>Human Umbilical Vascular Endothelial Cells</i>
<b>IC<sub>50</sub></b>	Índice de Concentração necessária para inibir 50%
<b>IGF</b>	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
<b>IPTG</b>	<i>Isopropyl <math>\beta</math>-D-1-thiogalactopyranoside</i>
<b>LAO</b>	L-aminoácido oxidase
<b>MATs</b>	Macrófagos Associados ao Tumor
<b>MEC</b>	Matriz Extracelular

<b>MET</b>	<i>Mesenquimal Epithelial Transition</i>
<b>MMP</b>	<i>Metalopeptidases de Matriz</i>
<b>mRNA</b>	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>
<b>MT-MMPs</b>	<i>Transmebrane Metallopeptidases</i>
<b>Ni-NTA</b>	<i>Níquel-Ntrilotriacetic Aacid</i>
<b>PI3K</b>	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
<b>PLA2</b>	<i>Fosfolipase A2</i>
<b>PPB</b>	<i>Peptídeos Potenciadores de Bradicinina</i>
<b>SDS</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
<b>SVMP</b>	<i>Snake Venom Metalloprotease</i>
<b>TEMED</b>	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i>
<b>TIMPs</b>	<i>Tissue Inhibitors of Metallopeptidases</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor Necrosis Factor- <math>\alpha</math></i>
<b>UV</b>	<i>Ultravioleta</i>
<b>VEGF</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

## SUMÁRIO

1.1 CÂNCER	1
1.2 O MICROAMBIENTE TUMORAL	1
1.3 ANGIOGÊNESE	3
1.4 METÁSTASE	4
1.5 MIGRAÇÃO CELULAR	5
1.6 INTEGRINAS	8
1.7 METALOPTIDASES	11
1.8 MEDICAMENTOS CONTRA O CÂNCER DERIVADOS DE VENENOS DE SERPENTES	12
1.9 VENENOS DE SERPENTES	13
1.10 SVMPs	14
1.11 DESINTEGRINAS	16
1.12 DisBA-01	18
<b>3. METODOLOGIA</b>	<b>21</b>
3.1 BIBLIOTECA DE cDNA	21
3.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO	21
3.3 DOSAGEM DE PROTEÍNA	21
3.4 LINHAGENS CELULARES	22
3.5 MIGRAÇÃO CELULAR	22
3.6 MIGRAÇÃO CELULAR - WOUND HEALING	23
3.7 ZIMOGRÁFIA	24
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>27</b>
4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO	27
4.2 MIGRAÇÃO - TRANSWELL	27
4.2.1 Fibroblastos	28
4.2.2 MDA-MB-231	28
4.2.3 DU-145	29
4.2.4 B16F10	30
4.3 MIGRAÇÃO CELULAR - WOUND HEALING	31
4.3.1 Fibroblastos	31
4.3.2 MDA-MB-231	33
4.3.3 DU-145	36
4.3.4 B16F10	37
4.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE METALOPTIDASES - ZIMOGRÁFIA	39
4.4.1 Fibroblastos	40
4.4.2 MDA-MB-231	41
4.4.3 DU-145	43
4.4.4 B16F10 – Wound Healing	45
4.4.5 B16F10 – Transwell	47
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>50</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>57</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>58</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### 1.1 CÂNCER

No Brasil, estima-se a ocorrência de 489.270 novos casos de câncer para o ano de 2011. Em 2008, cerca de 15% das mortes foram causadas por câncer, sendo a segunda maior causa de morte no país. Precedida apenas de doenças do sistema circulatório (INCA, 2009).

É uma doença originada de uma série de mutações causadas por agentes tóxicos ao DNA como o cigarro, radiação UV ou adquiridas de forma hereditária. Essas conferem as células cancerígenas grande capacidade de proliferação, adaptação ao microambiente e invasão dos tecidos vizinhos, promovendo a formação de uma massa tumoral em contínuo crescimento (Stratton *et al.*, 2009).

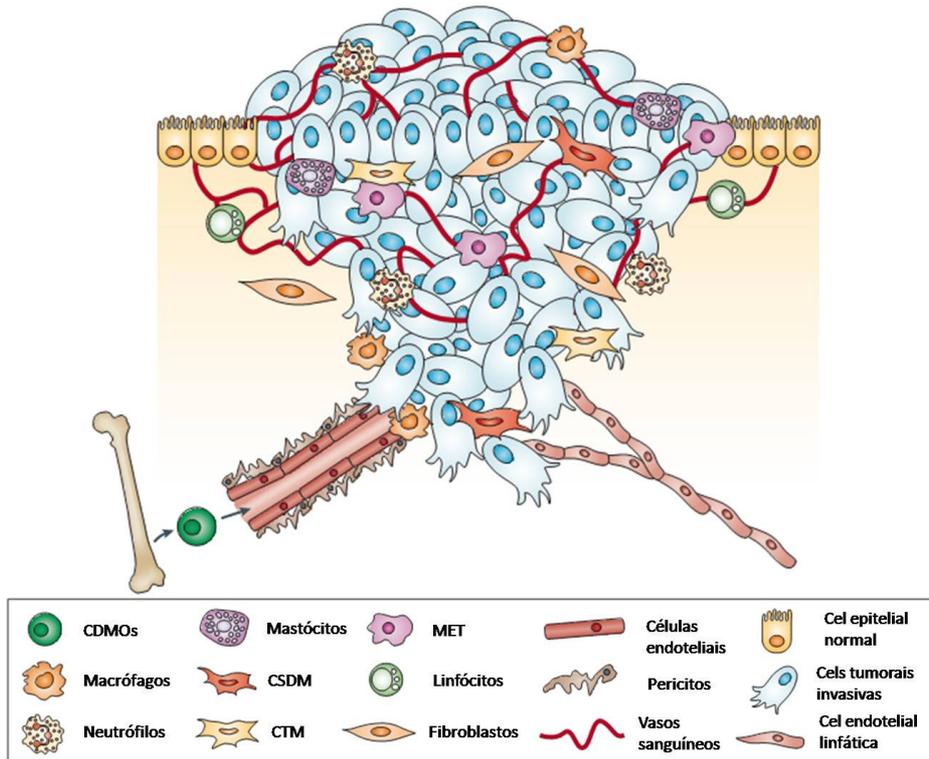
Durante a formação dessa massa, componentes celulares e acelulares presentes no microambiente, atuam liberando fatores de crescimento e proteases fundamentais para o desenvolvimento do tumor (Lee *et al.*, 2011).

### 1.2 O MICROAMBIENTE TUMORAL

Esse ambiente, no qual o tumor está presente, é composto por diferentes elementos que incluem a matriz extracelular (MEC), fatores de crescimento, citocinas, células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos. Entre eles, ocorre uma comunicação capaz de estimular o crescimento de tumor primário e modular a capacidade metastática de cada câncer (Bhowmick *et al.*, 2004; Joyce e Pollard 2009).

A MEC é a responsável pela manutenção da estrutura de órgãos, tecidos e células, além de funcionar como um reservatório de fatores de crescimento, está envolvida na transdução de sinais para o meio intracelular, através de moléculas de adesão (integrinas). É composta por fibras de colágeno, fibronectina, laminina, vitronectina, glicosaminoglicanos e proteoglicanos, produzidos principalmente por fibroblastos e células endoteliais (Hynes 2009; Worthley *et al.*, 2010). Seus componentes são flexíveis e de acordo com a tensão exercida sobre eles, os sítios de ligação para fatores de crescimento ou seus receptores são expostos, permitindo que a ligação ocorra. Um exemplo é o da vitronectina que se liga e regula componentes do complexo ativador de plasminogênio (Kim *et al.*, 2011).

Durante o início do desenvolvimento tumoral o microambiente age inibindo o crescimento do tumor primário e metastático. Entretanto, à medida que o tumor aumenta, reações inflamatórias ocorrem no local e sobrepõem a influência do microambiente, fazendo com que as células normais se tornem promotoras do crescimento tumoral (Joyce e Pollard 2009).



**Figura 1. O microambiente presente no tumor primário.**

O tumor primário é composto por células cancerígenas e diferentes tipos celulares que incluem células endoteliais, fibroblastos, células derivadas da medula óssea (CDMO), macrófagos, células supressoras derivadas da linhagem mielóide (CSDM), monócitos que expressam Tie-2 (Met) e células tronco mesenquimais (CTM) que compõem um complexo microambiente promotor do crescimento tumoral. Modificado de Joyce e Pollard, 2009.

Os fibroblastos possuem papel central na produção da MEC e de fatores de crescimento. Porém, quando estão em um ambiente tumoral, produzem fatores como o HGF (*hepatocytes growth factor*), EGF (*endothelial growth factor*) FGF2 (*fibroblast growth factor 2*) e metalopeptidases em níveis aumentados. Esses fatores estimulam sua própria migração para o interior do tumor, resultando em aumento da sobrevivência, proliferação e invasão de células tumorais (Bhowmick *et al.*, 2004; Kalluri e Zeisberg 2006). Essas características pertencem a uma subpopulação de fibroblastos que pode ser denominada de fibroblastos associados a carcinomas (FACs), fibroblastos ativados ou miofibroblastos, e são identificados por expressarem actina tipo  $\alpha$  do músculo liso. Pelo fato dos FACs manterem essas características mesmo sem contato com as células do tumor primário, pode-se sugerir que estes sejam capazes de seguir juntamente com células tumorais invasivas para o sítio metastático (Kalluri e Zeisberg 2006).

Assim como os fibroblastos, os macrófagos são células que possuem alta plasticidade, podendo agir como supressores ou promotores do tumor presentes no microambiente tumoral (Joyce e Pollard 2009). Os macrófagos associados ao tumor (MATs) produzem pequenas quantidades de citocinas pró-inflamatórias, possuem baixa capacidade de apresentar antígenos e produzem diferentes fatores de crescimento e angiogênicos, que vão estimular a proliferação tumoral e metástases. Em áreas hipóxicas, macrófagos são estimulados a produzir HIF-1 (*Hypoxia Inducing Factor-1*), aumentando a expressão do VEGF e conseqüentemente a angiogênese. Sabe-se que uma infiltração intensa de macrófagos está relacionada a um mau prognóstico em cânceres como o de mama, tireóide e bexiga. (Luo *et al.*, 2006; Alphonso e Alahari 2009).

### 1.3 ANGIOGÊNESE

Para que o crescimento tumoral ultrapasse 1-2mm<sup>3</sup>, é crucial que ocorra o fornecimento de oxigênio e nutrientes através de vasos sanguíneos (Hillen e Griffioen 2007). A angiogênese, formação de novos vasos a partir outros já existentes, ocorre a partir de uma mudança no equilíbrio entre fatores pré e anti angiogênicos. A hipóxia estimula a produção de fatores angiogênicos como o VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e FGF (*fibroblast growth factor*), que se ligam às células endoteliais estimulando a proliferação e produção de proteases que digerem a membrana basal e a matriz extracelular que as cercam. As células endoteliais começam então a migrar em feixes paralelos, na direção do VEGF (quimioatraente) para formar o novo vaso (Tonini *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2010). No entanto, para que esses eventos se realizem, é necessária a participação de células presentes nas adjacências do vaso que incluem pericitos, células de músculo liso, fibroblastos, macrófagos associados ao tumor (MATs) e as próprias células endoteliais que juntas fazem parte do complicado balanço entre os fatores pré e anti angiogênicos (Zhu *et al.*, 2010).

A vasculatura desenvolvida por tumores não é organizada, diferentemente dos vasos presentes em tecidos normais. Eles crescem de maneira desordenada, na presença de uma membrana basal incompleta, com paredes finas e são altamente permeáveis, o que permite o vazamento de proteínas do plasma e hemorragias locais, além de facilitar a entrada das células tumorais invasivas na corrente sanguínea (Tonini *et al.*, 2003).

O suprimento das células neoplásicas com nutrientes e oxigênio através da disseminação dos vasos favorece o crescimento do tumor, aumentando a quantidade de células que entram na circulação e conseqüentemente as chances de ocorrer metástases (Hanahan e Weinberg 2011).

### 1.4 METÁSTASE

A metástase é a responsável por 90% das mortes de pacientes acometidos por câncer. Ela é composta por uma complicada cascata de eventos, ainda não totalmente elucidada, que se iniciam no tumor primário. A contínua proliferação celular observada resulta na invasão de tecidos adjacentes e redução no contato com células vizinhas, facilitando seu desprendimento e o início do processo metastático (Fokas *et al.*, 2007; Chaffer e Weinberg 2011).

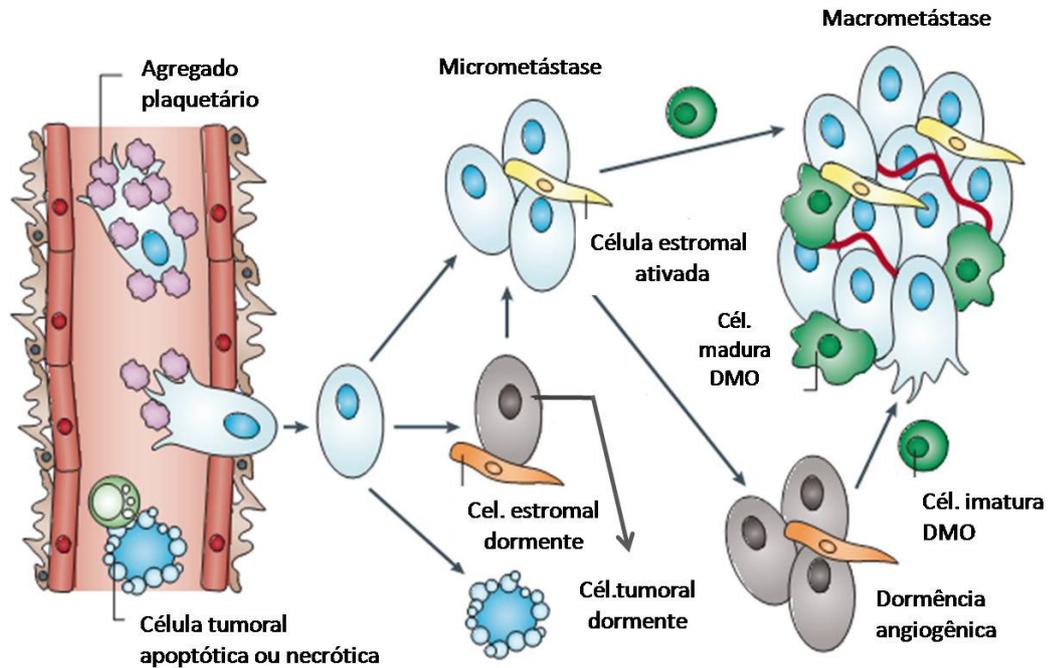
Para que o desprendimento ocorra, as células muitas vezes necessitam passar pela *epithelial mesenchymal transition* (EMT). Transição que induz a mudança de um fenótipo epitelial para o mesenquimal, levando a perda da polarização celular, redução na expressão de E-caderinas, aparecimento de fibras de stress e alteração das junções celulares (Christiansen e Rajasekaran 2006; Geiger e Peeper 2009). Células que passam pela EMT se tornam indiferenciadas e estão relacionadas à destruição de tecidos e metástase. Nos diferentes tipos de carcinomas as células podem passar por algumas alterações como a formação de fibras de stress e morfologia em fuso, porém sem adquirir todas as características mesenquimais. EMT incompleta, como são denominadas essas mudanças, podem estar presentes em estados de migração coletiva, que serão mencionadas mais adiante nesse trabalho (Christiansen e Rajasekaran 2006).

A (EMT) causa a desadesão das células do tumor primário, fazendo com que elas percam a capacidade de se aderir as suas vizinhas, adquiram características migratórias e invasivas necessárias para superar barreiras físicas e atingir seu sítio metastático. As células transformadas invadem os tecidos vizinhos, rompem a membrana basal, intravasam nos vasos sanguíneos e linfáticos culminando com seu extravasamento e estabelecimento em um novo sítio, onde darão origem a um tumor secundário. Durante todos esses estágios, as células enfrentam obstáculos, os quais reduzem o número de sobreviventes para cerca de 0,04% do total de células que caíam na corrente sanguínea. (Yilmaz *et al.*, 2007; Perret e Crépin 2008; Geiger e Peeper 2009).

Uma vez que as células se encontram dentro de vasos sanguíneos ou linfáticos, as plaquetas, formam agregados com as células tumorais protegendo-as durante o fluxo sanguíneo e facilitando seu extravasamento para o sítio de metástase. Esses agregados promovem a sobrevivência celular, diminuindo as chances das células serem destruídas por forças mecânicas e ataques de células do sistema imune, principalmente as células *natural killers* (Joyce e Pollard 2009).

Com a chegada das células tumorais ao seu sítio metastático, as células que passaram pela EMT, têm esse processo revertido através da *Mesenchymal to Epithelial Transition*

(MET) voltando a expressar sua morfologia epitelial, além das ligações intercelulares (E-caderinas e junções celulares) (Christiansen e Rajasekaran 2006).



**Figura 2. Colonização do sítio metastático.**

As células tumorais presentes na corrente sanguínea formam agregados com plaquetas, extravasam e colonizam o sítio metastático. No local envolvem células estromais e derivadas da medula óssea (DMO). Modificado de Joyce e Pollard, 2009.

As células que extravasaram e passaram pela MET podem seguir três caminhos (indicado na figura 2): a) ela pode não se adaptar ao microambiente e sofrer apoptose; b) pode permanecer quiescente e pela ação de algum estímulo proliferar formando micrometástases para em seguida voltar à dormência; e c) podem adaptar-se rapidamente ao meio, proliferar estimulando a angiogênese e recrutando células do estroma para promover o desenvolvimento de macrometástases (Perret e Crépin 2008; Chaffer e Weinberg 2011).

### 1.5 MIGRAÇÃO CELULAR

Se as células cancerígenas não possuíssem habilidade para se locomover, os tumores não teriam capacidade de produzir metástases e não se disseminariam. Nem todas as células são migratórias, no entanto as que constituem o sistema imune passam boa parte de suas vidas migrando, de forma individual, e conseguem responder a estímulos rapidamente. Outros tipos celulares podem apresentar capacidade migratória temporária, confinada a épocas específicas do desenvolvimento ou situações distintas como a cicatrização de feridas,

vascularização e inflamação. Esse tipo de migração ocorre freqüentemente em grupo, ou seja, sob a forma de migração coletiva (Rørth 2009). Entretanto, durante a progressão tumoral, as células cancerígenas podem migrar sob ambas as formas: individual e coletiva.

Na migração individual, as células podem praticar um movimento tipo amebóide ou mesenquimal (como citado anteriormente). Leucemias, linfomas e tumores no estroma (sarcomas) são adeptos desse tipo de locomoção (Friedl e Wolf 2003). Nesses tipos de migração a célula perde adesão com suas vizinhas e passa a migrar sozinha, invadindo o estroma e tecidos próximos.

A migração amebóide é o tipo mais simples de migração (figura 3), as células adquirem um formato arredondado ou elipsóide, são menos adesivas (independentes ou pouco dependentes de receptores de adesão) e rápidas (Schmidt e Friedl 2010). Nessa migração, as células passam por entre as fibras da matriz extracelular, sem a necessidade de utilizar outras ferramentas para chegar ao local desejado. Por outro lado, na migração mesenquimal as células possuem uma morfologia tipo-fibroblasto em forma de fuso (são células que passaram pela EMT) e se locomovem através da adesão de receptores celulares de superfície (integrinas) pelas fibras da MEC. Também possuem o auxílio de proteases como as metalopeptidases de matriz (MMPs), que estão co-localizadas com as integrinas nos sítios de adesão (complexos focais) clivando os componentes da matriz para facilitar a passagem das células (Friedl e Wolf 2003).

A migração coletiva é a principal forma de migração no câncer, encontrada principalmente em tumores de origem epitelial (carcinomas) e melanoma. É o tipo de migração, na qual as células se locomovem em conjunto mantendo algumas de suas junções intercelulares (Friedl e Bröcker 2000). Na migração em cadeia as células migram, alinhadas, deixando um rastro de matriz remodelada. Elas mantêm junções nas extremidades de cada célula sugerindo que ocorra algum tipo de comunicação entre elas. É uma eficiente forma de migração, que normalmente está ligada a um mau prognóstico (Friedl e Wolf 2003). Na migração e invasão coletiva as células passam por uma EMT parcial, mantendo suas junções intercelulares de forma a movimentarem-se juntas. Na frente migratória estão localizadas células que possuem alta mobilidade, enquanto as localizadas no centro e no final do conjunto são levadas passivamente. Sabe-se que participam do processo a integrina  $\beta 1$  na frente de migração e as MMP- 2 e MT1-MMP (Friedl e Wolf 2003).

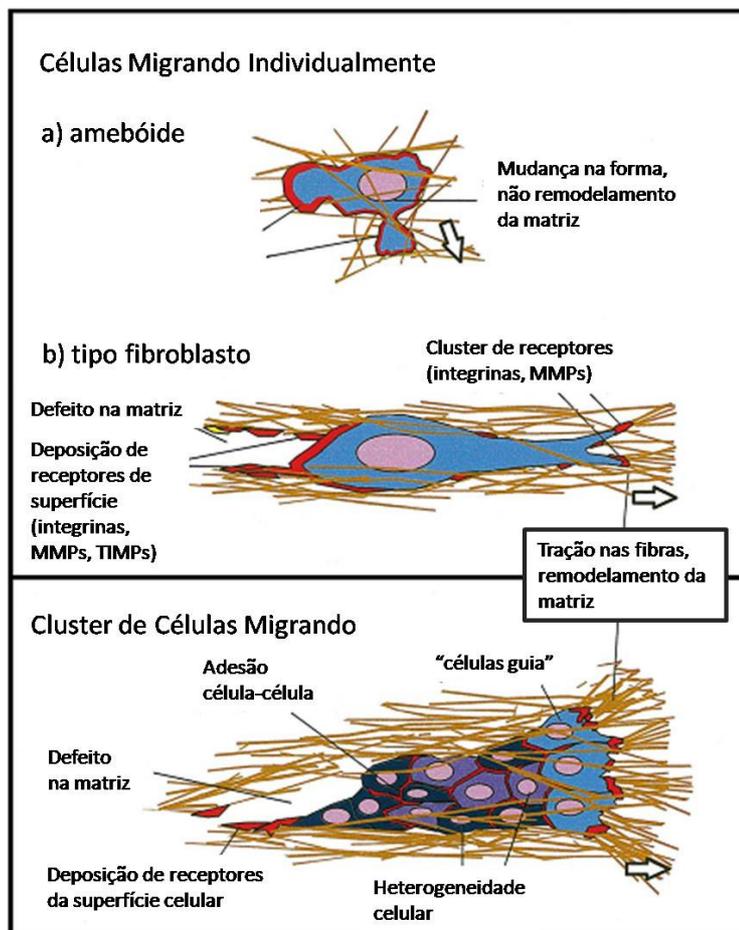


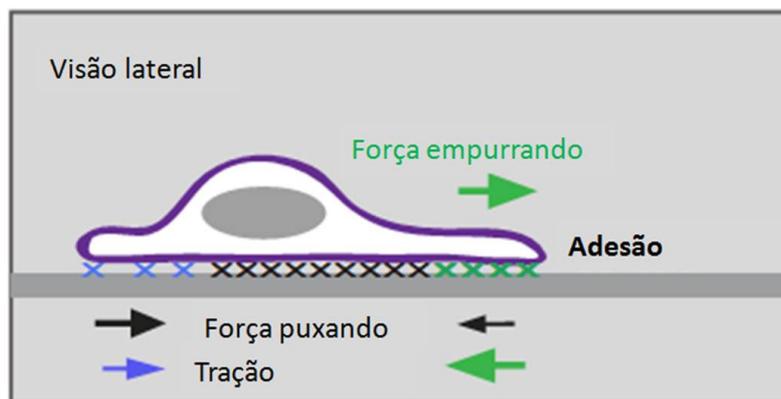
Figura 3. Tipos de migração.

A figura indica os tipos de migração individual e coletiva. Adaptado de Friedl e Brocker, 2000.

Para que a migração ocorra de forma eficiente, é necessário que as células sejam capazes de se adaptar ao ambiente que as cerca (Yilmaz *et al.*, 2007). A MEC, localizada nas diversas partes do organismo, possui diferentes composições, as quais podem afetar o modo de migração celular, resultando na transição de um tipo de migração para outro, de acordo com a estrutura da matriz ou situação a ser enfrentada. Matrizes que possuem poros largos favorecem o arredondamento celular e a migração amebóide, enquanto poros menores induzem o alongamento das células e a utilização de proteases, quando a célula é provida de tal instrumento. Já a composição da membrana basal, presente em volta dos vasos é densa e, portanto durante o intravasamento, as células que migram de forma coletiva precisam se desprender umas das outras, para conseguir entrar na circulação (Yilmaz *et al.*, 2007; Friedl e Wolf 2010).

Independente do tipo de migração todas as células precisam modificar sua morfologia, de modo que possam interagir com a matriz a sua volta, resultando em sua locomoção (figura 4). No processo migratório, ocorre primeiramente o alongamento celular causado pela

polarização dos filamentos de actina. A formação do podossomo ou invadopodia (ocorre principalmente em carcinomas) na frente de migração da célula, promove a adesão com as fibras da MEC, puxando todo o corpo celular e cauda para frente, e promove, também, a degradação da matriz quando necessário (Friedl e Wolf 2003; Yamaguchi *et al.*, 2005; Linder 2007). A ligação das células com a matriz acontece, principalmente, por meio das integrinas, que estão presentes na superfície celular, mediando a interação dos componentes da matriz com a actina do citoesqueleto, possibilitando a tração necessária para o movimento migratório (Schmidt e Friedl 2010).



**Figura 4. Visão lateral de uma célula migrando.**

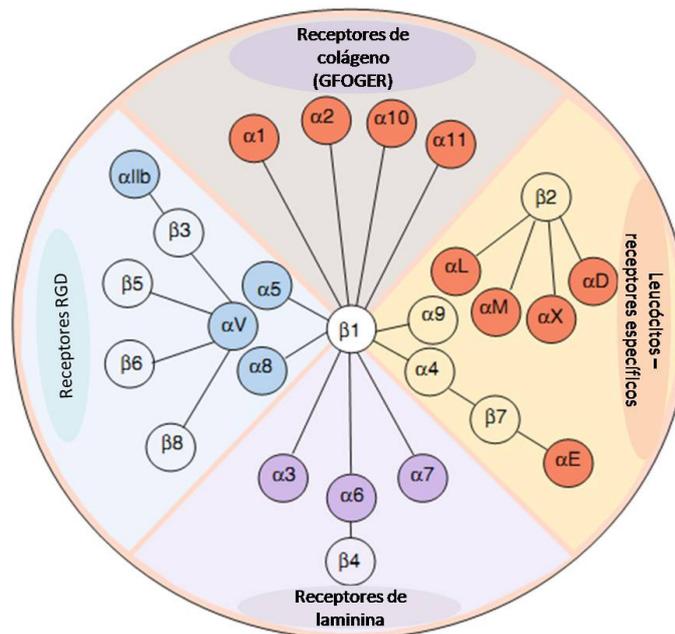
A frente de migração se estende e adere puxando todo o corpo celular para frente. Adaptado de Roth, 2011.

### 1.6 INTEGRINAS

Integrinas são uma família de receptores de adesão, heterodiméricos transmembrana. São compostas por 18 subunidades  $\alpha$  e 8  $\beta$ , formando pelo menos 24 heterodímeros diferentes (Desgrosellier e Cheresh 2010; Rathinam e Alahari 2010). Possuem uma porção curta intracelular ligada à quinases, que regulam processos de migração, invasão, proliferação e sobrevivência celular (Desgrosellier e Cheresh 2010). Sua porção extracelular é mais longa e, cada heterodímero possui afinidade por diferentes seqüências adesivas, como indica a figura 5. Uma parte delas se liga a moléculas que possuem a seqüência Arg-Gly-Asp (RGD) no motivo adesivo, outras são receptores para colágeno, laminina e outras proteínas que compõe a MEC, e existem ainda algumas que são receptores específicos para os leucócitos (Barczyk *et al.*, 2010).

Dependendo do ambiente, o perfil de integrinas de cada célula pode ser alterado rapidamente. Essas mudanças são capazes de alterar significativamente o comportamento celular dado que cada integrina regula diferentes funções. Nas células normais, as integrinas

$\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha 5\beta 1$  e  $\alpha 4\beta 6$  são expressas em baixas quantidades, porém em células tumorais possuem sua expressão aumentada (Goel *et al.*, 2008; Barczyk *et al.*, 2010; Desgrosellier e Cheresch 2010). Esse aumento indica que algumas integrinas estão diretamente relacionadas à agressividade do câncer, agindo em etapas como a angiogênese e metástase. Um exemplo pode ser dado pela integrina  $\alpha v\beta 3$ , superexpressa em linhagens de melanoma (Kang *et al.*, 2000), adenocarcinomas de próstata (Goel *et al.*, 2008) e células endoteliais presentes nos tumores, mas não em células endoteliais normais (Francavilla *et al.*, 2009).



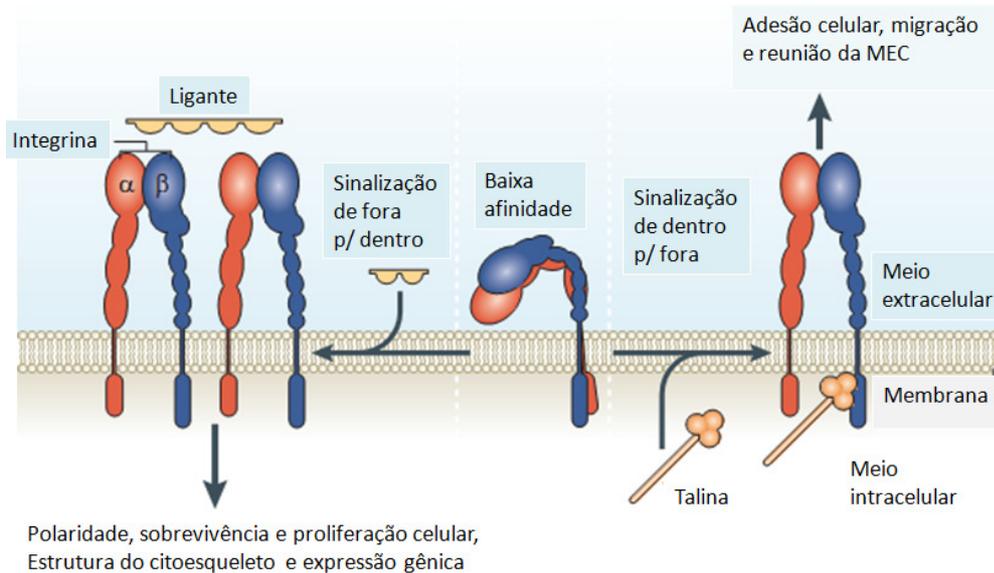
**Figura 5. Diferentes afinidades das diversas integrinas.**

Elas podem ser agrupadas de acordo com suas afinidades. Adaptado de Barczyk *et al.*, 2010.

As integrinas funcionam de forma bidirecional, transmitindo sinais tanto de dentro para fora (*inside-out*) como de fora para dentro (*outside-in*) das células. Eventos intracelulares ativam a sinalização *inside-out* por meio da ligação de proteínas intracelulares, como a talina com a subunidade  $\beta$  das integrinas. Como mostrado na figura 6, o heterodímero tem a conformação alterada, aumentando sua afinidade por ligantes extracelulares. Enquanto na sinalização *outside-in*, elas agem como receptores, interagindo com seus ligantes extracelulares e ativando vias de sinalização intracelulares, que irão desencadear algum dos processos citados anteriormente (Shattil *et al.*, 2010).

Devido ao vasto número de ligantes das integrinas, é essencial que elas possuam mecanismos que impeçam sua contínua interação com os mesmos. Assim, frequentemente as integrinas podem ser encontradas em estados de baixa afinidade, com seus domínios

extracelulares dobrados e as caudas intracelulares associadas. No momento da ativação as porções extracelulares são estendidas e as caudas intracelulares de cada subunidade afastadas (Moser *et al.*, 2009).



**Figura 6. Ativação das integrinas e a sinalização inside-out e outside-in.**

As integrinas podem ser ativadas tanto de dentro para fora de células, quanto de fora para dentro. No centro da figura elas se encontram no estado de baixa afinidade. Adaptado de Shattil *et al.*, 2010.

A ativação das integrinas e interação com seus ligantes podem levar ao desenvolvimento de *clusters*, agregados de integrinas, que formam pontos focais de adesão (chamados contatos focais) e ativam vias intracelulares. A cascata de sinalização se inicia com a *focal adhesion kinase* (FAK), uma enzima que recebeu esse nome devido à sua localização. Ela é regulada através de fosforilação e participa da sinalização envolvida com a migração celular e do *cross-talk* entre integrinas e receptores de fatores de crescimento. A partir da clusterização das integrinas, a FAK se autofosforila, criando afinidade pelas src quinases, que são ativadas e fosforilam novamente a FAK, promovendo sua interação com outras proteínas. O complexo FAK-src age então fosforilando a paxilina e/ou a p130cas que irá resultar na ativação da Rac, uma proteína pertencente à família Rho de proteínas ligadas ao GTP (Harburger and Calderwood 2009; Zhao and Guan 2010). Em outra via, a FAK forma complexos, de forma independente, com a PI3K e Grb7, uma proteína adaptadora, e induz a ativação também da Rac que controla a actina cortical e a ação da lamelipodia na frente de migração. Além das cascatas citadas, a FAK utiliza a via v-Src-Cas-Crk-Dock180 para

promover a expressão das metalopeptidases 2 e 9, ligadas a invasão celular, metástases e angiogênese (Zhao e Guan 2010).

### 1.7 METALLOPEPTIDASES

Na homeostase, o remodelamento da matriz é extremamente controlado por MMPs e *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs), seus inibidores fisiológicos. Porém, em doenças como o câncer e artrite reumatóide, o equilíbrio é perdido resultando na degradação exacerbada por essas proteínas (Bourboulia e Stetler-Stevenson 2010).

As MMPs têm como principal função a proteólise dos componentes da MEC, desempenhando papéis fundamentais em situações fisiológicas como na embriogênese, cicatrização de feridas e angiogênese (Forget *et al.*, 1999; Chang e Werb 2001).

Essas enzimas são endopeptidases dependentes de zinco, produzidas sob a forma de precursores inativos. Atualmente, sabe-se da existência de 23 MMPs em humanos, classificadas de acordo com seus domínios. Todas possuem um peptídeo sinal, que direciona a proteína para o retículo endoplasmático, um pró-peptídeo que a mantém sob a forma inativa e o domínio catalítico que contém o motivo de ligação ao zinco. Elas possuem ainda o domínio tipo hemopexina no C-terminal, que proporciona especificidade na ligação com inibidores e substratos, além de apresentar os últimos ao sítio catalítico. Esse domínio está presente em quase todas metalopeptidases, com exceção das MMPs 7 e 26 (Bourboulia e Stetler-Stevenson 2010; Kessenbrock *et al.*, 2010).

Elas são ativadas no momento em que ocorre a dissociação entre um resíduo de cisteína, presente no pró-domínio e o zinco do domínio catalítico ou ainda uma por uma modificação química do resíduo de cisteína (Bourboulia e Stetler-Stevenson 2010; Kessenbrock *et al.*, 2010). A ativação pode ocorrer tanto dentro como fora da célula, sendo a maioria ativada no meio extracelular por meio de outras MMPs ativas ou serinoproteases. Apenas as MMPs 11, 28 e as MT-MMPs (*transmembrane metalloproteinases*) são ativadas por serinoproteases antes de serem secretadas ou chegar à membrana celular (Egeblad e Werb 2002; Bourboulia e Stetler-Stevenson 2010; Kessenbrock *et al.*, 2010).

A degradação de proteínas da matriz como fibronectina, colágeno e laminina por MMPs facilita a passagem das células por entre as fibras da MEC e libera fatores de crescimento, que irão atuar nas próprias células, estimulando a produção de mais MMPs, e da migração e invasão celular. Um exemplo disso é demonstrado pela ação da MMP-9 sobre as proteínas da MEC, elevando os níveis de VEGF biodisponíveis em um evento que antecede a

vascularização tumoral (Kessenbrock *et al.*, 2010). Em células de câncer de mama, foi comprovado que MMPs clivam as E-caderinas e integrinas, induzindo a EMT e aumentando a expressão de MMPs e eventos metastáticos. (Bourboulia e Stetler-Stevenson 2010; Radisky e Radisky 2010).

Além de agir na EMT, as MMPs participam ativamente do processo de invasão celular, no qual a integrina  $\alpha\beta3$  se co-localiza com a MMP-2 na frente migratória, realizando uma degradação restrita da MEC, para a passagem celular. É proposto, que a forma ativa da MMP esteja ligada a integrina na superfície de células endoteliais (Vartak *et al.*, 2009). Foi demonstrado ainda, a ação das gelatinases, MMP-2 e 9, na interação com a integrina  $\alpha\beta3$  em melanoma *in vivo*, promovendo a invasão e em células de câncer de mama, induzindo a migração (Bourboulia e Stetler-Stevenson 2010).

A inibição da atividade dessas proteases ocorre pela ação das TIMPs, moléculas encontradas na maioria dos tecidos e fluidos corporais. Elas são uma família de quatro membros, TIMPs 1, 2, 3 e 4, todas secretadas sob a forma solúvel, com exceção da TIMP-3, que está ligada a MEC. Em conjunto, esses inibidores agem equilibrando a síntese e degradação produzida pelas MMPs, que é crucial para o funcionamento normal dos órgãos (Forget *et al.*, 1999; Kessenbrock *et al.*, 2010). Em um microambiente tumoral há o rompimento desse equilíbrio, induzindo a diminuição da atividade das TIMPs, e/ou o aumento da expressão de MMPs, resultando na promoção do desenvolvimento tumoral (Bourboulia e Stetler-Stevenson 2010; Radisky e Radisky 2010).

### 1.8 MEDICAMENTOS CONTRA O CÂNCER DERIVADOS DE VENENOS DE SERPENTES

Alguns peptídeos inibidores das MMPs conseguiram chegar a fases de testes clínicos como agentes antitumorais, entretanto devido à falta de especificidade e efeitos colaterais exacerbados, todos falharam (Vartak *et al.*, 2009).

Recentemente, uma molécula descoberta no meio da década de 90, chegou à fase III de testes clínicos para o tratamento de glioblastoma. O cilengitide é um pentapeptídeo cíclico, que possui motivo RGD, com atividade antiangiogênica e o primeiro medicamento tendo como alvo as integrinas  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$  e  $\alpha5\beta1$ . Ele vem sendo testado em conjunto com radioterapia, tendo obtido bons resultados no aumento da sobrevida dos pacientes. Porém, em outros tipos de câncer como o de pâncreas, os resultados alcançados não foram melhores do que os obtidos com drogas normalmente utilizadas (Mas-Moruno *et al.*, 2010).

Proteínas presentes em venenos de serpentes, desde a antiguidade fascinaram os pesquisadores por sua complexa composição e baixas concentrações necessárias para obtenção de efeitos biológicos importantes. Atualmente, estão no mercado algumas drogas derivadas de venenos. O primeiro a ser descoberto e o mais famoso foi o captopril, medicamento anti-hipertensivo, que inibe a enzima conversora de angiotensina (ECA). A molécula que serviu de base para o desenho do Captopril®, foi isolada do veneno da *Bothrops jararaca*. Pode ser citado também a Haemocoagulase, um pro - coagulante descoberto a partir do veneno da *Bothrops atrox*, além do Aggrastat e Eptifibatide® (Integrilin), que são utilizados como antiagregantes e foram produzidos a partir das desintegrinas echistatina e barbourina, respectivamente, proteínas de baixa massa molecular presentes em venenos de serpentes (Koh e Kini 2011).

### 1.9 VENENOS DE SERPENTES

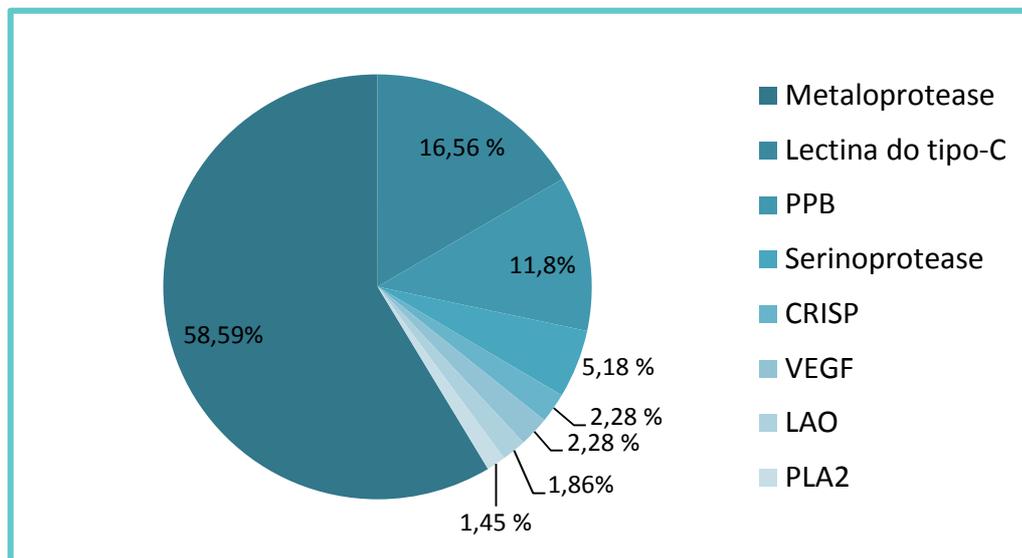
Venenos de serpentes possuem centenas de compostos farmacologicamente ativos, que desencadeiam os mais complexos efeitos biológicos. Isso se deve a uma mistura de moléculas orgânicas e minerais como histamina, alérgenos, poliaminas, alcalóides e pequenos peptídeos e proteínas (Calvete *et al.*, 2005). Apesar do veneno como um todo ser tóxico, seus componentes, quando isolados podem ser utilizados para fins terapêuticos, devido a seletividade e efetividade das suas ligações aos receptores, requisitos necessários para um bom fármaco (Eble 2010).

Cerca de 90% dos casos dos acidentes por serpentes venenosas ocorridos no Brasil, são causados por venenos botrópicos. São venenos classificados como hemorrágicos, causando dano ao tecido local, dor, edema, hemorragia, necrose, desordens na coagulação e falência renal, sendo a última a maior causa de morte (Queiroz *et al.*, 2008; Gay *et al.*, 2009).

Apesar das semelhanças existentes na composição dos venenos de serpentes pertencentes à mesma espécie, variações podem ocorrer de acordo com a origem, habitat, dieta, sexo e idade das serpentes (Queiroz *et al.*, 2008).

No transcriptoma da *Rinocerophis alternatus* (*Bothrops alternatus*), produzido em nosso laboratório, 8 diferentes categorias de moléculas tóxicas foram encontradas (figura 5). A biblioteca de cDNA foi produzida a partir do mRNA da glândula venenífera da *R. alternatus* (*B. alternatus*), resultando em transcritos de metaloproteases (58,59%), lectinas tipo-C (16,56%), PPB - peptídeos potenciadores de bradicinina (11,8%), serinoproteases (5,18%), CRISP - proteína secretora rica em cisteína (2,28%), VEGF - fator de crescimento

vascular endotelial (2,28%), LAO - L-aminoácido oxidases (1,86%) e PLA2 - fosfolipase A2 (1,45%) (Hirayama 2011).



**Figura 5. Transcriptoma do veneno da *Rinocerothis alternatus*.**

O gráfico indica as porcentagens dos transcritos de moléculas tóxicas encontradas na biblioteca. Retirado de Hirayama, 2011(dados não publicados).

A nomenclatura usada atualmente, leva em consideração o estudo feito por Fenwick *et al.*, (2009), em que estes através da análise de características morfológicas e moleculares, propuseram uma nova classificação para o gênero *Bothrops*. Quatro principais linhagens monofiléticas são recuperadas considerando-as como gênero, e o antigo grande grupo do gênero *Bothrops* fica dividido nos gêneros *Bothrops*, *Rinocerothis*, *Bothriopsis* e *Bothropoides*. Nessa nova classificação, a espécie *Bothrops alternatus* passa a compor o gênero *Rinocerothis* (Fenwick *et al.*, 2009)

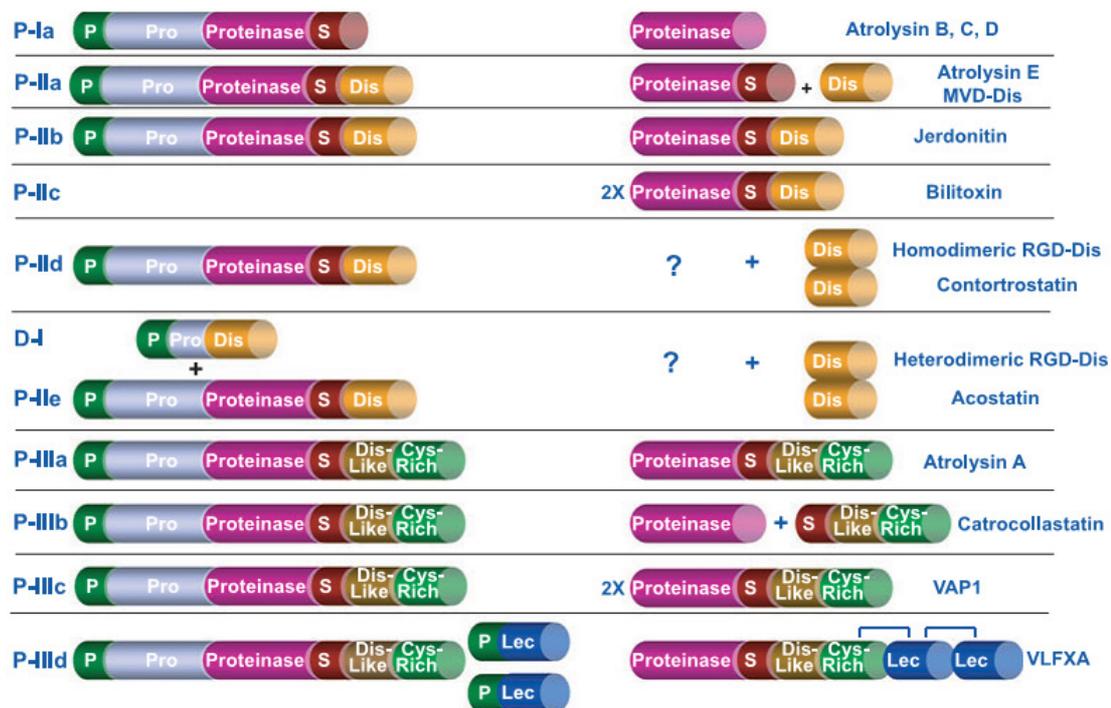
As SVMPs que são os componentes mais abundantes presentes nos venenos do gênero *Bothrops* (Cidade *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2010) possuem similaridades com as MMPs, mas com diferenças importantes. Ambas pertencem à superfamília das metzincinas e possuem um íon zinco no sítio catalítico. Porém, enquanto as SVMPs são classificadas de acordo com a presença de domínios desintegrinas, rico em cisteína e lectina tipo C as metalopeptidases possuem os domínios adicionais tipo hemopexina e fibronectina tipo II (presente apenas nas MMP-2 e 9) (Eble 2010).

#### 1.10 SVMPs

As metaloproteases de venenos de serpentes (SVMPs) são enzimas dependentes de zinco, que possuem múltiplos domínios e importante papel na patologia do envenenamento

(Fox e Serrano 2005; Fox e Serrano 2008). Seu principal efeito tóxico é a perturbação do sistema hemostático, causando hemorragias locais e sistêmicas, degradação da membrana basal, inflamação e necrose (Kamiguti *et al.*, 1996; Teixeira, *et al.*, 2005).

Elas foram divididas em classes de P-I a P-III, de acordo com a presença dos domínios encontrados nos transcritos de RNAm e proteínas processadas presentes no venenos, figura 6. A classe P-I, possui apenas o pró-domínio e o domínio proteínase. A classe P-II é acrescida do domínio desintegrina, que gera diferentes fragmentos de acordo com processamento proteolítico. Essa classe dá origem a moléculas que possuem sequências adesivas com grande afinidade por integrinas. A P-III possui um pró-domínio, o domínio protease, tipo desintegrina e rico em cisteína, também subclassificados de acordo com processamento proteolítico. Os domínios tipo desintegrinas possuem também sequências adesivas que se ligam as integrinas, porém sendo diferentes das encontradas em P-II (Gutiérrez e Rucavado 2000; Ramos e Selistre-de-Araujo 2006; Fox e Serrano 2008).



**Figura 6. Classes de SVMPs.**

Metaloproteases antes e depois do processamento. Os pontos de interrogação representam compostos ainda não identificados no veneno e o S situado entre os domínios significa *spacer*. Adaptado de Fox e Serrano, 2008.

A síntese do veneno ocorre no citoplasma das células da glândula venenífera, e o processamento das formas inativas é realizado durante a saída do complexo de Golgi e entrada nas vesículas, até sua liberação pelas mesmas no lúmen da glândula (Fox e Serrano

2008). No momento da inoculação do veneno pela serpente, os domínios metaloproteases das SVMPs são liberados, sob sua forma ativa e geralmente separados dos domínios desintegrinas e tipo-desintegrina (Fox e Serrano 2008). Essas proteínas são desprovidas de atividade enzimática e possuem uma sequência adesiva composta por um tripeptídeo. As proteínas tipo-desintegrinas normalmente possuem as sequências DCD (Asp-Cys-Asp) ou ECD (Glu-Cys-Asp) e são provenientes da classe P-III das SVMPs. No caso do domínio desintegrina, derivados do processamento da classe P-II a sequência mais encontrada é a RGD (Arg-Gly-Asp) (Ramos e Selistre-de-Araujo 2006; Fox e Serrano 2008).

A superfamília das metzincinas, da qual fazem parte as SVMPs, compreendem um grupo de proteínas denominadas de *A Desintegrin And Metalloproteinase* (ADAMs), presentes em várias espécies e consideradas homólogas as SVMPs. As ADAMs possuem domínios extremamente similares, principalmente com as SVMPs da classe P-III. Todas são constituídas por um peptídeo sinal, domínios pró- e metaloprotease, domínio tipo desintegrina e o rico em cisteína. Elas podem também conter os domínios tipo EGF, transmembrana e citoplasmático. Apesar de possuírem o domínio metaloprotease bem conservado, apenas cerca de 25 das 40 ADAMs têm atividade catalítica. Elas participam de diversos processos fisiológicos, como a sinalização celular, migração, diferenciação e embriogênese. Além disso, podem estar superexpressas em diversos tipos de tumores, participando de processos importantes na formação e desenvolvimento tumoral como a proliferação, angiogênese e metástases (Lu *et al.*, 2008).

### 1.11 DESINTEGRINAS

As desintegrinas são um grupo de polipeptídios ricos em resíduos de cisteína, de baixa massa molecular, capazes de inibir a agregação plaquetária com alta especificidade e eficiência (Gould *et al.*, 1990). Huang e colaboradores, em 1987, foram os primeiros a descrever a ação de uma desintegrina sobre a agregação das plaquetas. A trigramina, uma desintegrina RGD, inibiu a agregação plaquetária estimulada por ADP através da interação com a integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , o receptor de fibrinogênio presente na superfície das plaquetas (Huang *et al.*, 1987).

As desintegrinas, como indica a tabela 2, podem ser divididas de acordo com seu tamanho e número de ligações dissulfeto, em pequenas, médias, longas e diméricas, cada uma contendo de 41-51, ~70, ~84 e ~67 aminoácidos respectivamente. Ainda entram nessa classificação, as proteínas tipo desintegrinas constituídas de 100 aminoácidos e 8 ligações

dissulfeto juntamente com o domínio rico em cisteína contendo de 110-120 aminoácidos e 6 ligações dissulfeto (Calvete *et al.*, 2005).

A sequência adesiva dessas proteínas se encontra no ápice de uma alça (loop) saliente situada entre duas fitas  $\beta$ . A manutenção tanto dos aminoácidos do motivo adesivo e das sequências adjacentes, quanto à conformação das pontes de dissulfeto, é de fundamental importância para a atividade da desintegrina. A substituição dos aminoácidos da sequência adesiva e adjacentes a ela leva a perda, quase que total da atividade e diminuição da potência da molécula, respectivamente, enquanto que a quebra das pontes dissulfeto, resulta na abolição da ligação as integrinas (Gould *et al.*, 1990; McLane *et al.*, 1998).

**Tabela 1. Classificação das desintegrinas de acordo com o comprimento da cadeia polipeptídica e presença de subunidades.**

<b>Comprimento</b>	<b>Número de a.a</b>	<b>Número de ligações dissulfeto</b>
<b>Pequenas</b>	41-51	4
<b>Médias</b>	~70	6
<b>Longas</b>	~84	7
<b>Diméricas</b>	~67 (por cadeia)	10 (4 intra e 2 intercadeia)

Fonte: Calvete *et al.*, 2005.

A existência de outras sequências adesivas, presentes no ápice do *loop* resulta em diferentes especificidades e afinidades por diferentes integrinas, e conseqüentemente distintas atividades biológicas. As desintegrinas constituídas pelos tripeptídeos KTS e RTS se ligam à integrina  $\alpha 1\beta 1$ , receptores específicos de colágeno. As que têm o motivo MVD ainda não possuem ligantes determinados, porém de acordo com alguns ensaios a integrina  $\alpha_{IIB}\beta_3$  pode ser um de seus alvos. O domínio MLD se liga as integrinas  $\alpha 4\beta 1$  e  $\alpha 9\beta 1$ , atuando em leucócitos. As desintegrinas que possuem os motivos KGD, MGD, VGD e WGD compartilham o mesmos alvos do motivo RGD, as integrinas  $\alpha_{IIB}\beta_3$ ,  $\alpha v\beta 3$  e  $\alpha 5\beta 1$  (Calvete *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2008). Esses alvos são os receptores de vitronectina ( $\alpha v\beta 3$ ), fibronectina ( $\alpha 5\beta 1$ ) e fibrinogênio ( $\alpha_{IIB}\beta 3$ ).

Desde seu descobrimento, as desintegrinas vêm sendo estudadas em pesquisas envolvendo agregação de plaquetas, proliferação celular, apoptose, adesão, migração e angiogênese (Moiseeva *et al.*, 2008). Sua ligação com as integrinas geralmente é potente, sendo necessárias concentrações nanomolares para a visualização dos efeitos biológicos em

testes *in vitro* e micromolares para testes *in vivo* (Chiang *et al.*, 1994; Selistre-de-Araujo *et al.*, 2010).

Ensaio envolvendo a migração e invasão celular também foram realizados. Entre eles estão estudos com as desintegrinas rhodostomina, contortostatina, saxatilina e salmosina que foram testadas em ensaios de migração *transwell* e todas foram capazes de inibir significativamente a migração de células tumorais (Kang *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008).

### 1.12 DisBa-01

A DisBa-01, desintegrina utilizada nesse projeto, foi produzida a partir de uma biblioteca de cDNA construída com o RNAm da glândula venenífera da *Rhinocerosphis alternatus*, figura 7. Ela possui motivo RGD, uma massa de 11,780 Da e afinidade pela subunidade  $\beta_3$ . Pode ser classificada como uma desintegrina média por ser monomérica, possuir 78 aminoácidos e 6 ligações dissulfeto (Ramos *et al.*, 2008).

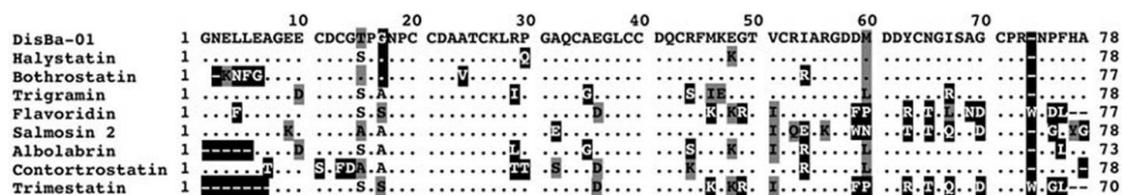


Figura 7. Comparação da sequência de aminoácidos da DisBa-01 com diferentes desintegrinas.

Os resíduos idênticos aos da DisBa-01 são representados por pontos. Marcados de cinza são resíduos similares mas não conservados e marcados em preto são as substituições por resíduos não similares. Adaptado do Ramos *et al.*, 2008.

Estudos anteriores comprovaram que ela inibe fortemente a adesão e a proliferação em vitronectina das células de melanoma murino B16F10 e HMEC-01 (*Human Microvascular Endothelial Cell-1*). Experimentos *in vivo*, demonstraram que a DisBa-01 causa uma diminuição na presença de células endoteliais na angiogênese induzida por bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) em matrigel e na formação de novos vasos, com uma IC<sub>50</sub> de 83nM. Foi realizado também, um ensaio com células B16F10-2B8 em camundongos, para avaliar a capacidade da DisBa-01 de prevenir metástases no pulmão. A maior inibição ocorreu na concentração de 2 mg/kg, a qual induziu uma diminuição de 69,8% no aparecimento de metástases pulmonares (Ramos *et al.*, 2008). Kauskot *et al.*, 2008 verificaram o efeito da DisBa-01 sobre plaquetas, constatando que ela além inibir fortemente a função da integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  em plaquetas *in vitro* e *in vivo*, a agregação plaquetária com IC<sub>50</sub> 203nM e prolongar o

tempo de sangramento na cauda de camundongos, induz a inibição da fosforilação da FAK, quando estimulada por ADP (Kauskot *et al.*, 2008).

Estudos recentes constataram que a DisBa-01, quando imobilizada em placa, de se aderir a fibroblastos, células de câncer de mama MDA-MB-231 e melanoma murino B16F10. Desde que se mostrou capaz de interagir com essas linhagens, outros ensaios foram realizados com as mesmas. Foi verificado, que ela inibe a adesão sob fluxo da MDA-MB-231 e B16F10 ao colágeno I e estimula a desadesão das mesmas células também sob um *coat* de colágeno I. Porém, não obteve efeito sobre proliferação de fibroblastos e da MDA-MB-231. Estudos envolvendo a angiogênese também foram realizados. A DisBa-01 diminuiu a expressão do VEGF e seus receptores VEGFR1 e VEGFR2 em células HMEC-1 e inibiu ainda a expressão do VEGF em fibroblastos e MDA-MB-231 nos tempos de 24 e 48 horas respectivamente (Ribeiro 2009; dados não publicados), desse modo, confirmando *in vitro* sua afinidade por células endoteliais e sua ação sobre a angiogênese.

Considerando o relevante papel da integrina  $\alpha\beta3$  e MMPs na disseminação metastática, nossa hipótese proposta nesse trabalho foi a de que a ligação desta integrina com uma desintegrina RGD, no caso a DisBa-01, poderia afetar a migração e invasão de células tumorais que consequentemente reduziria a ocorrência de metástases.

### **2. OBJETIVOS**

Investigar o efeito da DisBa-01 na migração, invasão e atividade de metalopeptidases em linhagens de células tumorais de adenocarcinoma de mama humano, MDA-MB-231, carcinoma de próstata, DU-145, B16F10 de melanoma murino e em fibroblastos humanos (FH).

### **3. METODOLOGIA**

#### 3.1 BIBLIOTECA DE cDNA

A expressão e purificação da DisBa-01 foi realizada de acordo com protocolo estabelecido por Ramos *et al.*, (2008). Resumidamente, a biblioteca de cDNA foi produzida a partir da glândula venenífera da *Rhinocerophis alternatus* utilizando o sistema UNIZAP (Stratagene, La Jolla, CA, USA). O RNA total foi extraído da glândula com Trizol e o RNAm purificado através do sistema PolyAtract (Promega, Pittsburgh, PA, USA). Foram desenhados *primers* com base nas seqüências de DNA de desintegrinas de venenos de serpentes, na tentativa de amplificar desintegrinas homólogas da *R. alternatus* a partir da biblioteca. Para a clonagem foram utilizados, o vetor pET28a (Novagen- Madison, WI, USA) e as enzimas *Bam HI* e *Eco RI* sendo o fragmento de DNA ligado através da T4 DNA *ligase* (Invitrogen – Carlsbad, CA, USA). Os plasmídeos foram inseridos em células de *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  e selecionados em meio contendo canamicina. A confirmação dos clones foi feita em seqüenciador ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer – Foster City CA, USA). Os plasmídeos recombinantes (pDisBa-01) foram utilizados para transformar a linhagem de *E. coli* BL21(DE3).

#### 3.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO

A proteína foi expressa através da indução das culturas de *E. coli* BL21(DE3) em meio LB seletivo, contendo canamicina 30  $\mu\text{g/ml}$ . A indução com IPTG 0,5 mM ocorreu quando a D.O<sub>660</sub> da cultura se encontrou entre 0.4 e 0.6. Após 3 horas de indução as células foram centrifugadas, ressuspensas e lisadas por ultra-som. Para retirar a proteína dos corpos de inclusão, as células foram ressuspensas em tampão contendo uréia (6 M) e submetidas novamente ao ultra-som. A primeira parte da purificação foi feita sob condições desnaturantes, através de cromatografia de afinidade em coluna de Níquel-NTA Sepharose (Quiagen), sendo a proteína eluída em gradiente de imidazol, dialisada contra água e seguida de uma segunda purificação em coluna Mono Q 5/50 (GE Healthcare) em gradiente de NaCl. As frações foram analisadas com SDS-PAGE e armazenadas a 4°C (Ramos *et al.*, 2008).

#### 3.3 DOSAGEM DE PROTEÍNA

As frações da proteína obtidas a partir da Mono Q foram quantificadas pelo *BCA Assay Kit* (Pierce). O kit funciona por meio da detecção do  $\text{Cu}^{1+}$  reduzido pelo ácido

bicinconínico, produzindo uma coloração azul escura que pode ser lida no comprimento de onda de 562 nm. As dosagens foram realizadas de acordo com as instruções do kit. Rapidamente, foram feitas diluições conhecidas de soro albumina bovina (BSA) nas concentrações de 30 µg/mL a 2000 µg/mL para a construção da curva padrão. As amostras e diluições de BSA foram então adicionadas à placa de 96 poços, incubadas com os tampões A (ácido bicinconínico) e B (sulfato cúprico) na proporção de 50:1 e a leitura feita no comprimento de onda de 595nm utilizando o software Dynex Revelation 4.02. Para análise do resultado foi realizado uma regressão linear, utilizando as absorbâncias das diluições do BSA.

### 3.4 LINHAGENS CELULARES

Neste trabalho foram utilizadas três linhagens tumorais, MDA-MB-231 de adenocarcinoma de mama (independente de estrogênio), DU-145 de câncer de próstata, B16F10 de melanoma murino e uma linhagem normal de fibroblastos humanos (provenientes da gengiva).

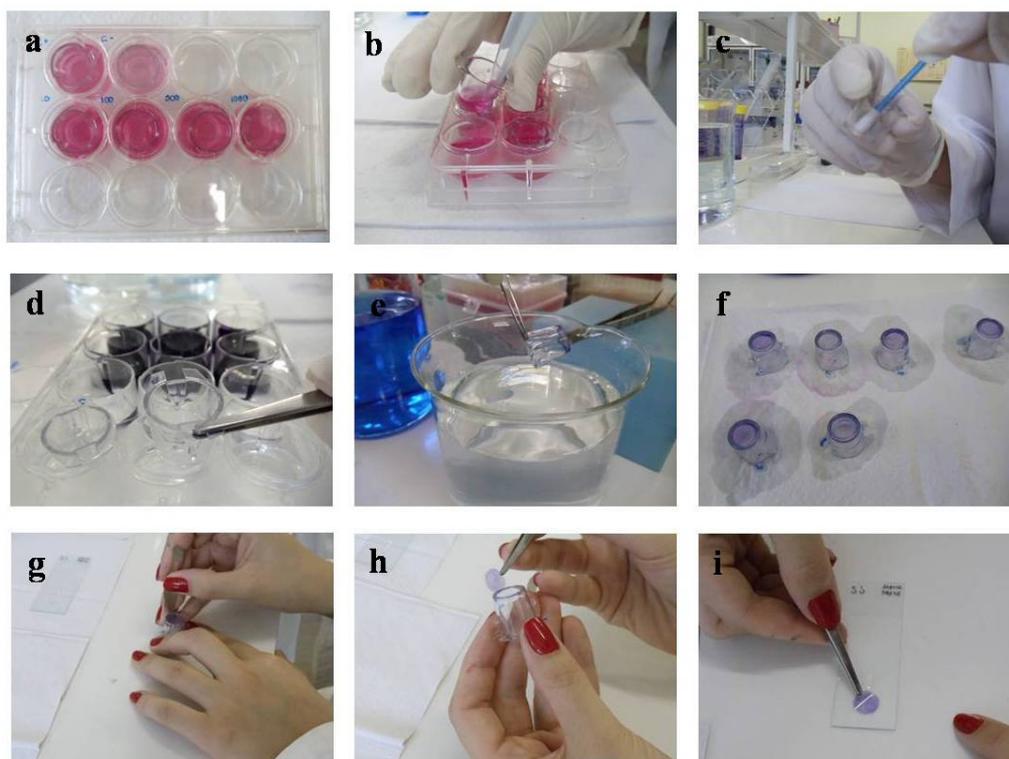
As linhagens MDA-MB-231 e fibroblastos humanos (FH) foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Cultilab), contendo soro fetal bovino a 10% (FBS), L-glutamina, antibióticos (penicilina/estreptomicina) e antifúngico (anfotericina B). As células DU-145 e B16F10 foram cultivadas em meio RPMI 1640, contendo 10% de FBS, L-glutamina, antibióticos 0,1mg/mL (penicilina/estreptomicina) e um antifúngico (anfotericina B). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, em estufa umidificada.

### 3.5 MIGRAÇÃO CELULAR

O ensaio de migração foi feito de acordo com Tian *et al.*, 2007, com modificações. Resumidamente, foram utilizados insertos de 8 µm em placas de 12 poços (Becton Dickinson), as células utilizadas (FH, MDA-MB-231, DU-145 e B16F10), que estavam em cerca de 70% de confluência, foram tripsinizadas e ressuspensas em DMEM ou RPMI sem soro. Foram adicionadas à parte superior do inserto 1.10<sup>5</sup> células, contendo DisBa-01 nas concentrações de 10, 100, 500 e 1000 nM, enquanto meio contendo 10% de soro foi adicionado ao compartimento inferior (Tian *et al.*, 2007). Para a linhagem B16F10 foi utilizado meio condicionado como agente quimiotático. A mudança foi necessária, devido à falta de resposta das células de melanoma ao soro do meio, quando utilizado como quimioatratante. O meio condicionado foi realizado de acordo com Li *et al.*, 2009, com modificações, foi adicionado DMEM sem soro em uma garrafa de cultura de fibroblastos,

com cerca de 80% de confluência, e a mesma incubada a 37°C. Após 24 horas, o meio foi coletado, centrifugado e congelado para posterior utilização (Li *et al.*, 2009). O controle positivo foi feito sem a adição da proteína e o negativo sem a proteína e sem a adição de soro a placa, para todas as linhagens.

Após 22 horas de incubação a 37°C, os insertos foram fixados em metanol, corados com azul de toluidina 2% e as lâminas montadas, como mostra a figura 8. Estas foram fotografadas em 10 campos aleatórios e as células contadas. Foram realizados três experimentos independentes (Tian *et al.*, 2007).



**Figura 8. Revelação de ensaio de migração transwell.**

Após 22 horas de incubação, a placa foi retirada da estufa (a), o meio da parte superior removido (b), os insertos limpos com o auxílio de cotonetes (c), e em seguida foram fixados em metanol e corados com azul de toluidina a 2% (d). Para a retirada do excesso de corante foram mergulhados em água (e) e deixados para secar por algumas horas (f). Quando a membrana secou, foi recortada com um estilete (g) e com o auxílio de uma pinça retirada do inserto (h), foi coberta por óleo de imersão em uma lâmina e recoberta com uma lamínula (i).

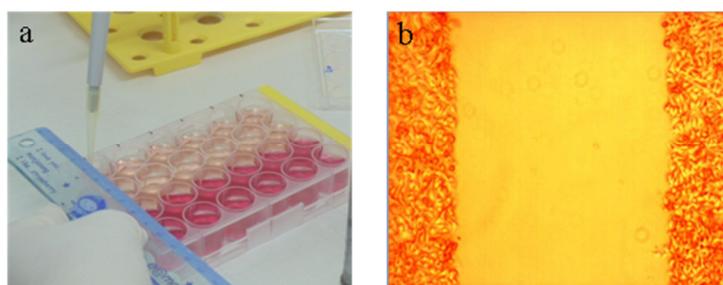
### 3.6 MIGRAÇÃO CELULAR - WOUND HEALING

O ensaio de *wound healing* é muito utilizado para o estudo das características da migração celular, assim como para a validação de moléculas, que podem interferir no processo migratório (Yarrow *et al.*, 2004). Assim, utilizou-se esse experimento com o

objetivo de analisar a ação da DisBa-01 sobre a migração das linhagens tumorais e de fibroblastos. O ensaio foi realizado da seguinte maneira:

1. As células ( $1.10^5$ ) foram tripsinizadas, contadas e adicionadas em placas de 24 poços.
2. Ao alcançarem a confluência foi feita a ferida (risca), utilizando ponteiras de 100  $\mu$ l e com auxílio de uma régua, como mostra a figura abaixo.
3. Os poços foram lavados uma vez, com o meio adequado para cada tipo celular e a proteína adicionada, nas concentrações especificadas no item anterior, em meio contendo 10% de soro.
4. Nos controles foram adicionados apenas o meio com soro.

A linhagem B16F10 recebeu um tratamento diferenciado, devido a sua alta taxa de proliferação. Sendo assim, os ensaios de *wound healing* foram realizados em meio contendo apenas 4% de soro. As placas foram fotografadas nos tempos de 0, 24 e 48 horas (Golubkov *et al.*, 2003; Galán *et al.*, 2008).



**Figura 9. Realização do ensaio de *wound healing*.**

Na figura, (a) demonstra como a ferida foi feita, utilizando a ponteira e com o auxílio da régua, e (b) é uma foto tirada logo após a realização da ferida em células B16F10.

A análise dos resultados foi realizada com o auxílio do software Image J, a partir da medida da área do risco utilizando a fórmula:  $(A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}})/(A_{\text{inicial}}) \times 100 = \% \text{ de fechamento da ferida}$ , sendo A, a medida da área entre as bordas (Yue *et al.*, 2010).

### 3.7 ZIMOGRAFIA

Para mimetizar o processo de migração os ensaios celulares para zimografia foram feitos no formato de *wound healing*. A técnica de zimografia é utilizada para verificação da presença de metalopeptisases (MMPs) em gel de poliacrilamida a 10%, com adição de gelatina. Ele possibilita a visualização das MMPs 9, 2 e em menor intensidade a MMP-1, através da degradação da gelatina presente no gel (Cleutjens *et al.*, 1995).

As células ( $2.10^5$ ) foram transferidas para placas de 12 poços e deixadas até a confluência. Fizeram-se as feridas com ponteiras de 100  $\mu$ l e auxílio de uma régua, em

seguida os poços foram lavados uma vez com meio e as células incubadas por 24 horas em meio sem soro e com ou sem a adição da DisBa-01. Após 24 horas, os sobrenadantes foram coletados, centrifugados e congelados a -20°C.

Também foi realizada a zimografia de uma linhagem, a B16F10, no ensaio *transwell* para verificar se diferentes estímulos induziriam uma expressão diferenciada das MMPs. Para esse ensaio, o meio contido na parte superior do inserto transwell foi retirado, centrifugado e congelado a -20°C. Os passos seguintes foram realizados em conjunto com as outras linhagens.

As amostras quantificadas com o auxílio do nanodrop ND-1000 foram testadas para a verificação da melhor massa de proteína a ser utilizada com 10, 30, 50, 80 e 100 µg do sobrenadante de cada linhagem celular. Os sobrenadantes foram então concentrados de acordo com a quantidade a ser utilizada no gel. Foram necessários 10 µg de proteína do sobrenadante dos FH, 50µg do sobrenadante da MDA-MB-231, 100 µg do sobrenadante da DU-145 e 80µg da B16F10. Com a adição de 10µl de tampão sem β-mercaptoetanol, as amostras foram aplicadas ao gel de SDS-PAGE 10% contendo gelatina (tabela 2).

Após a eletroforese, os géis foram lavados duas vezes por 20 minutos em solução de 2,5% de Triton X-100, para a retirada do SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) e então incubados por 18-20 hs a 37°C em tampão contendo 50 mM Tris, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,02% de NaN<sub>3</sub> e 10 mM de ZnCl<sub>2</sub>. Em seguida, foram corados por uma hora com *Coomassie Blue Brilliant R-250* e descorados em ácido acético:metanol:água (1:4:5) (Cleutjens *et al.*, 1995; Marqueti *et al.*, 2008). A atividade das metalopeptidases foi analisada por densitometria pelo Gene Tools v3.06 software (Syngene, Cambridge, UK).

**Tabela 2. Gel de Poliacrilamida a 10% com gelatina para zimografia.**

Reagentes	Gel de separação a 10%	Gel de empilhamento
Tris HCl pH 8.8	1,4 mL	-----
Tris HCl pH 6.8	-----	172,6 µL
Acrilamida 30%	1,65 mL	270 µL
Glicerol	43 µL	-----
SDS 10%	56 µL	18 µL
H <sub>2</sub> O	1,85 mL	1,31 mL
Gelatina 100mg/ml	50 µL	-----
TEMED	40 µL	6,76 µL
PSA 10%	20 µL	20,3 µL

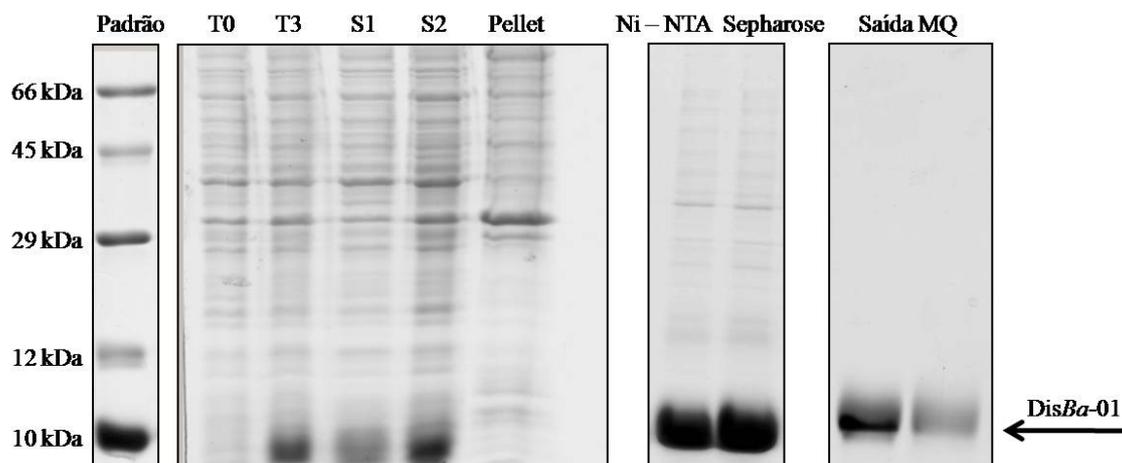
### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi feita com o cálculo da média e do erro padrão para cada experimento através do programa Graphpad 5.00 utilizando a análise de variância ANOVA one-way e o teste de Tukey.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO

Para análise das diferentes etapas da expressão da proteína, foram retiradas alíquotas logo após a adição do IPTG (T0), após as três horas de indução (T3), e após a primeira (S1) e a segunda sonicação em solução desnaturante (S2). Em seguida, o sobrenadante em solução desnaturante (S2) foi filtrado e eluído na coluna de Ni-NTA sepharose em gradiente de imidazol (figura 10). Apenas com esta cromatografia não é possível obter frações completamente puras, então estas foram submetidas novamente a cromatografia, mas desta vez em coluna de troca iônica coluna (Mono Q).



**Figura 10. Expressão e purificação da DisBa-01 em gel de SDS-PAGE (15%).**

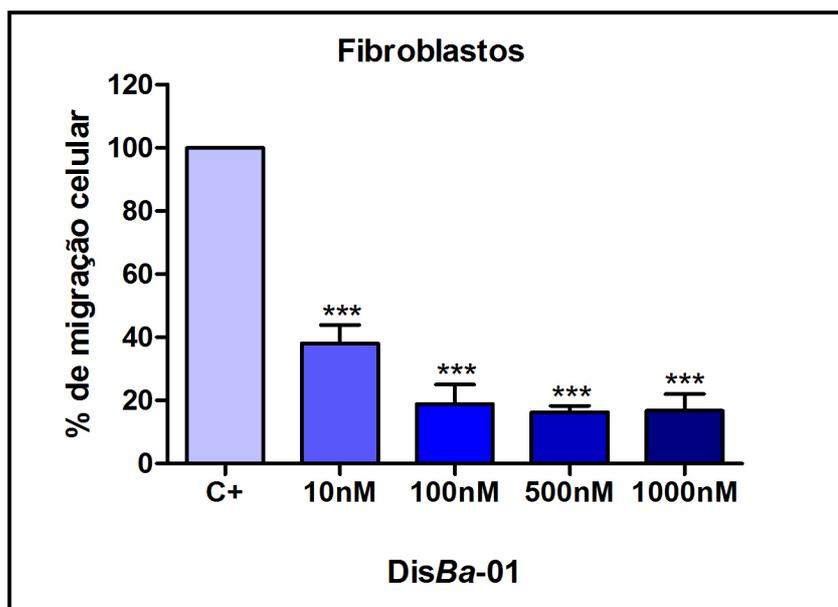
Indução com IPTG foi feita em T0 e após três horas foi coletada uma segunda amostra (T3). A banda correspondente a DisBa-01, na altura de aproximadamente 12kDa, pode ser observada no gel. Em S1 (sobrenadante 1) está a proteína solubilizada sob condições não denaturantes, e em S2 (sobrenadante 2) se encontra a proteína em solução contendo uréia (6M). No gel seguinte estão as bandas correspondentes a DisBa-01 saídas da coluna de níquel – NTA sepharose (em solução contendo uréia), seguida das amostras saídas da coluna mono Q.

### 4.2 MIGRAÇÃO - TRANSWELL

Durante o ensaio de *transwell*, as células são estimuladas a migrar em direção aos fatores de crescimento, que se ligam a seus receptores e ativam a migração celular (Albini e Benelli 2007). Para estudar os efeitos da DisBa-01 sobre migração das linhagens de fibroblastos, câncer de mama, próstata e melanoma, foi adicionado o meio de cultura com soro a 10% na parte inferior do inserto e a DisBa-01 juntamente com as células e meio sem soro na parte superior.

4.2.1 Fibroblastos

A figura 11 mostra que quando incubados com a DisBa-01, os fibroblastos, tiveram sua migração inibida em mais de 50% para todas as concentrações testadas. De forma mais detalhada, houve uma inibição de 62% na concentração de 10 nM, 82% com 100 nM, 84% com 500 nM e 81% com 1000 nM. A inibição foi eficaz em todas as concentrações, porém não houve diferenças significativas entre elas.

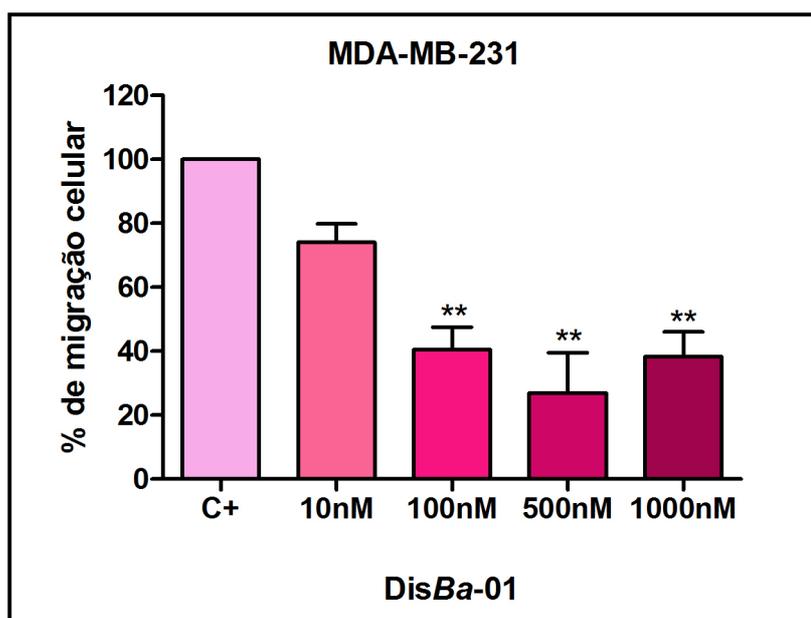


**Figura 11. Inibição da migração de fibroblastos humanos pela DisBa-01.**

As células foram tripsinizadas e adicionadas ao inserto em meio sem soro contendo DisBa-01 nas concentrações de 10, 100, 500 e 1000 nM. O quimioatratante utilizado foi meio contendo 10% de FBS. Foram realizados três experimentos individuais e a análise estatística foi feita utilizando ANOVA one-way seguido do teste de Tukey \*\*\*p<0,0001.

4.2.2 MDA-MB-231

A migração da linhagem de adenocarcinoma de mama foi inibida em todas as concentrações, com exceção da concentração de 10 nM que não levou a uma inibição significativa. Foi a linhagem que menos respondeu a inibição causada pela DisBa-01 (figura 12). Houve uma inibição da migração de 26%, 59%, 73% e 62% nas concentrações de 10, 100, 500 e 1000 nM, sendo a resposta concentração-dependente. Apesar da tendência de aumento no número de células que migraram na concentração de 1000 nM quando comparada com a de 500 nM, a diferença não chegou a ser significativa.

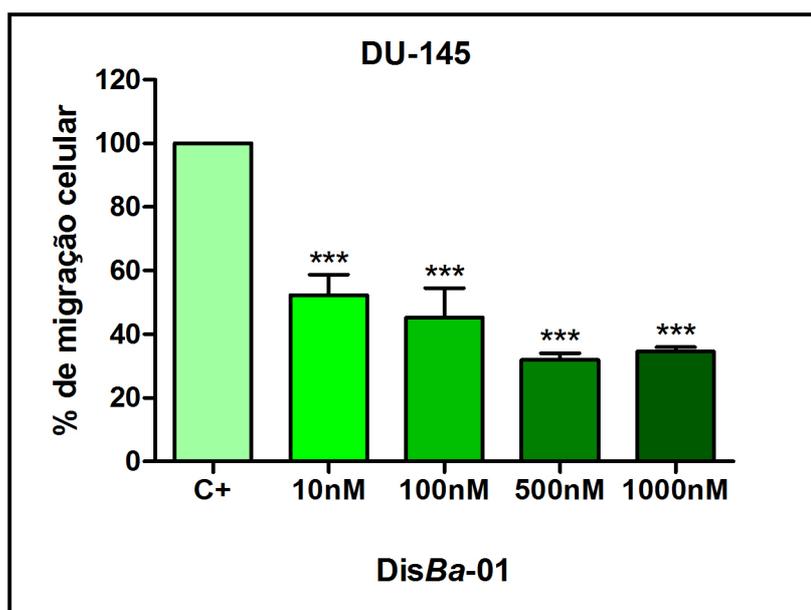


**Figura 12.** Migração de células MDA-MB-231 pela ação da *DisBa-01*.

As células foram tripsinizadas e adicionadas ao inserto em meio sem soro contendo a *DisBa-01* nas concentrações de 10, 100, 500 e 1000 nM. O quimioatratante utilizado foi meio contendo 10% de FBS. Foram realizados três experimentos individuais e a análise estatística foi feita utilizando ANOVA one-way seguido do teste de Tukey \*\*\* $p < 0,0003$ .

#### 4.2.3 DU-145

Todas as concentrações testadas inibiram a migração da linhagem de câncer de próstata, DU-145. Em todas, a inibição causada pela *DisBa-01* foi maior que 40% (figura 13). Sendo 47% para 10 nM, 55% para 100 nM, 68% para 500 nM e 64% para 1000 nM. Não houve diferença significativa entre as concentrações testadas, apesar da tendência de diminuição entre as concentrações de 10 a 500 nM. Como observado nas linhagens anteriores a mesma tendência não é observada para a concentração de 1000 nM.

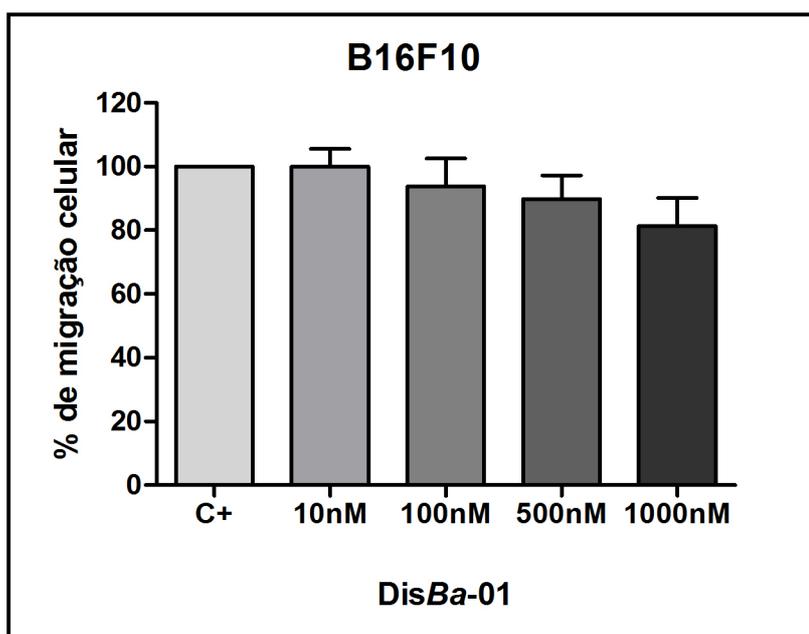


**Figura 13. Inibição da migração de células DU-145 pela ação da DisBa-01.**

As células foram tripsinizadas e adicionadas ao inserto em meio sem soro contendo a DisBa-01 nas concentrações de 10, 100, 500 e 1000 nM. O quimioatraente utilizado foi meio contendo 10% de FBS. Foram realizados três experimentos individuais e a análise estatística foi feita utilizando ANOVA one-way seguido do teste de Tukey \*\*\* $p < 0,0001$ .

#### 4.2.4 B16F10

No ensaio de migração *transwell* com a linhagem de melanoma murino, o quimioatraente utilizado foi o meio condicionado de fibroblastos. Dessa forma, a DisBa-01 não foi capaz de inibir de forma significativa a migração das células B16F10 em nenhuma das concentrações testadas (figura 14).



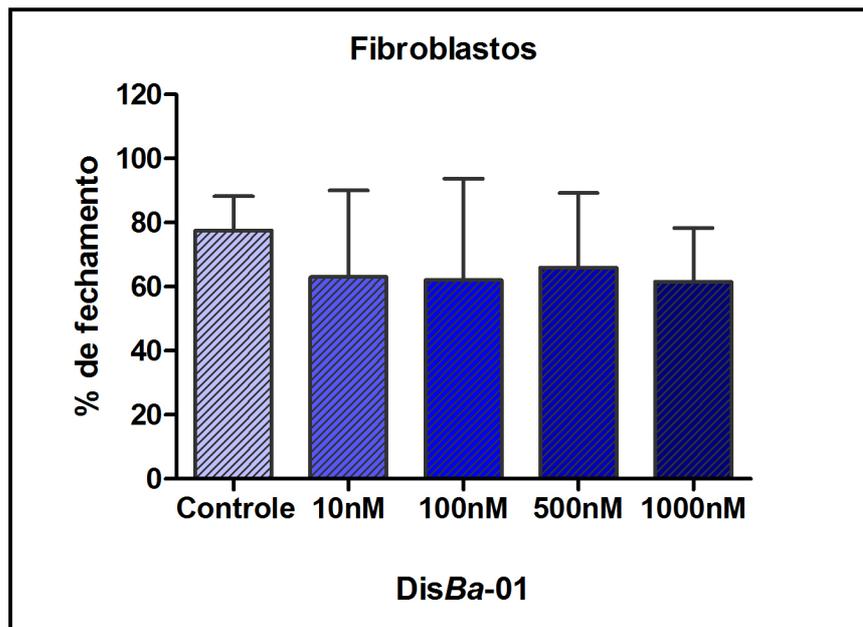
**Figura 14.** Efeito da DisBa-01 na migração das células B16F10.

As células foram tripsinizadas e adicionadas aos insertos em meio sem soro e o meio condicionado foi adicionada a placa. Foram realizados três experimentos individuais. Não houve diferença estatística as concentrações testadas.

#### 4.3 MIGRAÇÃO CELULAR - WOUND HEALING

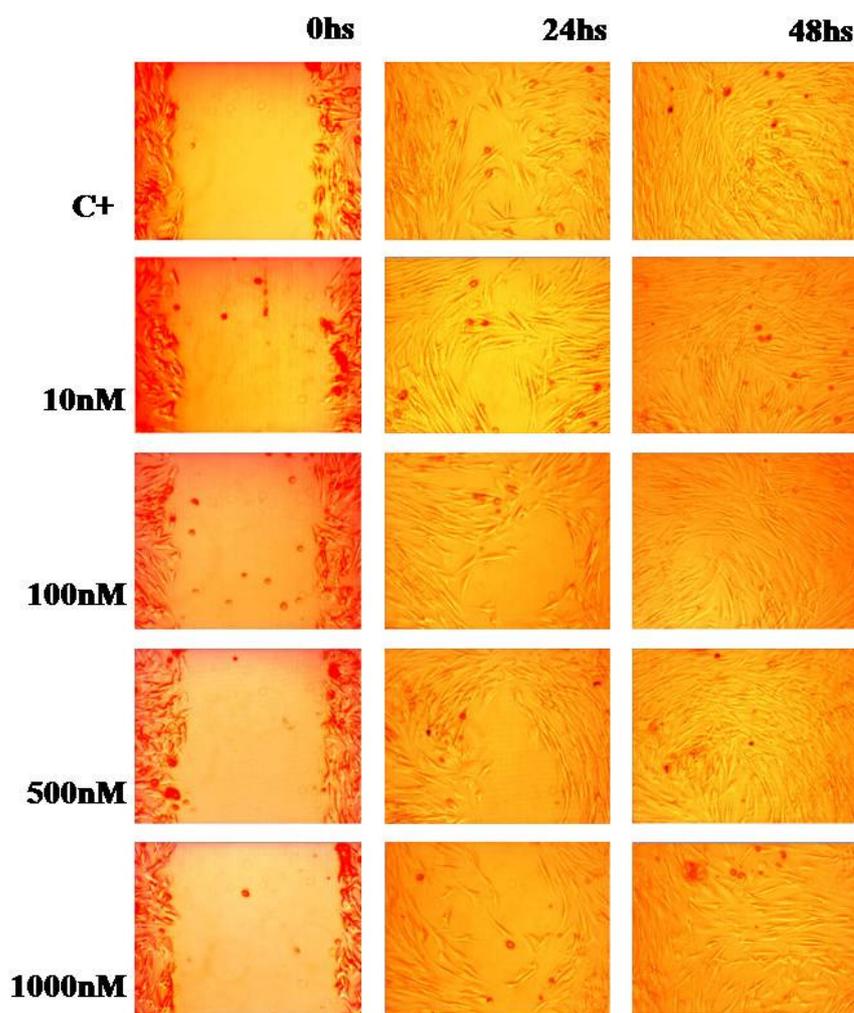
##### 4.3.1 Fibroblastos

Para os testes de *wound healing* foram realizados três experimentos em duplicata. Não houve uma diferença estatística significativa entre as concentrações testadas e o controle. Diferentemente do ensaio de migração *transwell* que inibiu a migração de forma concisa. A figura 15 apresenta análise quantitativa do fechamento da “ferida” em porcentagem nos tempos de 0-24 horas. Enquanto a figura 16 apresenta as fotos de uma das replicatas nos tempos de 0, 24 e 48 horas.



**Figura 15. Efeito da DisBa-01 na linhagem de fibroblastos humanos no *wound healing*.**

A ferida foi realizada em placas de 12 poços e as células incubadas com diversas concentrações da DisBa-01. Foram feitos três experimentos em duplicata e a análise estatística foi realizada utilizando ANOVA one-way e o teste de Tukey. Não houve diferença significativa entre as concentrações testadas no tempo de 0-24hs.

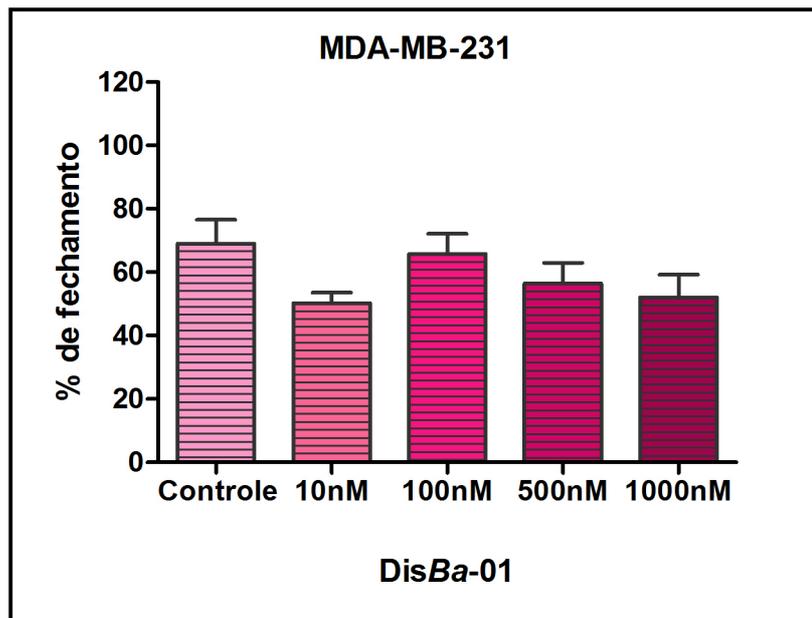


**Figura 16. Wound healing em fibroblastos.**

As fotos foram tiradas nos tempos de 0, 24 e 48 horas após a realização das “feridas” nas concentrações de 10, 100, 500 e 1000 nM. São representativas de uma replicata do *wound healing* em fibroblastos.

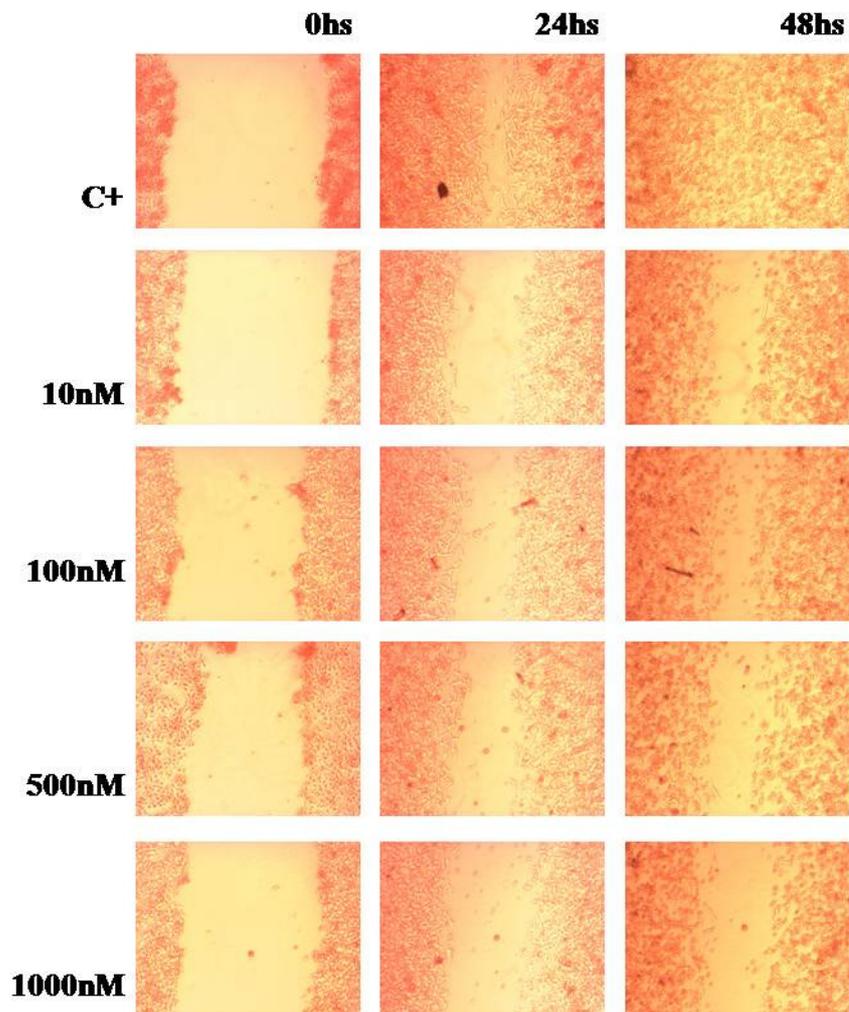
#### 4.3.2 MDA-MB-231

Assim como nos fibroblastos, a MDA-MB-231 não apresentou resultados significativos (Figura 17). A figura 18 apresenta as fotos de uma das replicatas do ensaio, nos tempos de 0, 24 e 48 horas. Pela figura é possível observar diferenças no modo de migração entre as células, sugerindo que, na placa, a MDA-MB-231 possua um tipo de migração individual.



**Figura 17.** Efeito da *DisBa-01* em células de câncer de mama no tempo de 0-24hs em ensaio de *wound healing*.

A ferida foi realizada em placas de 24 poços e as células incubadas com diversas concentrações da *DisBa-01*. Foram feitos três experimentos em duplicata e a análise estatística foi feita utilizando ANOVA one-way e o teste de Tukey. Não houve diferença significativa entre as concentrações testadas.

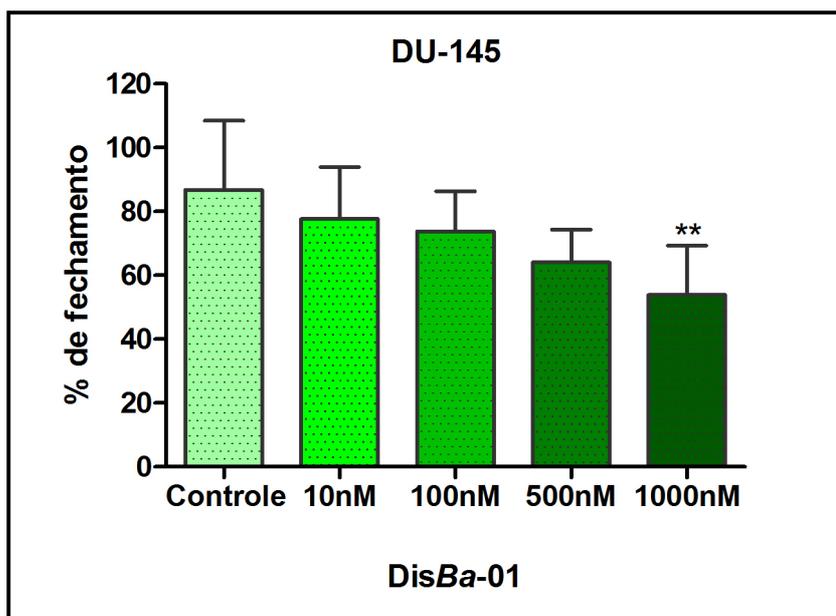


**Figura 18. Wound healing na linhagem MDA-MB-231.**

As fotos foram tiradas nos tempos de 0, 24 e 48 horas após a realização das “feridas”. São representativas de uma replicata do *wound healing* na MDA-MB-231 nas concentrações exemplificadas acima.

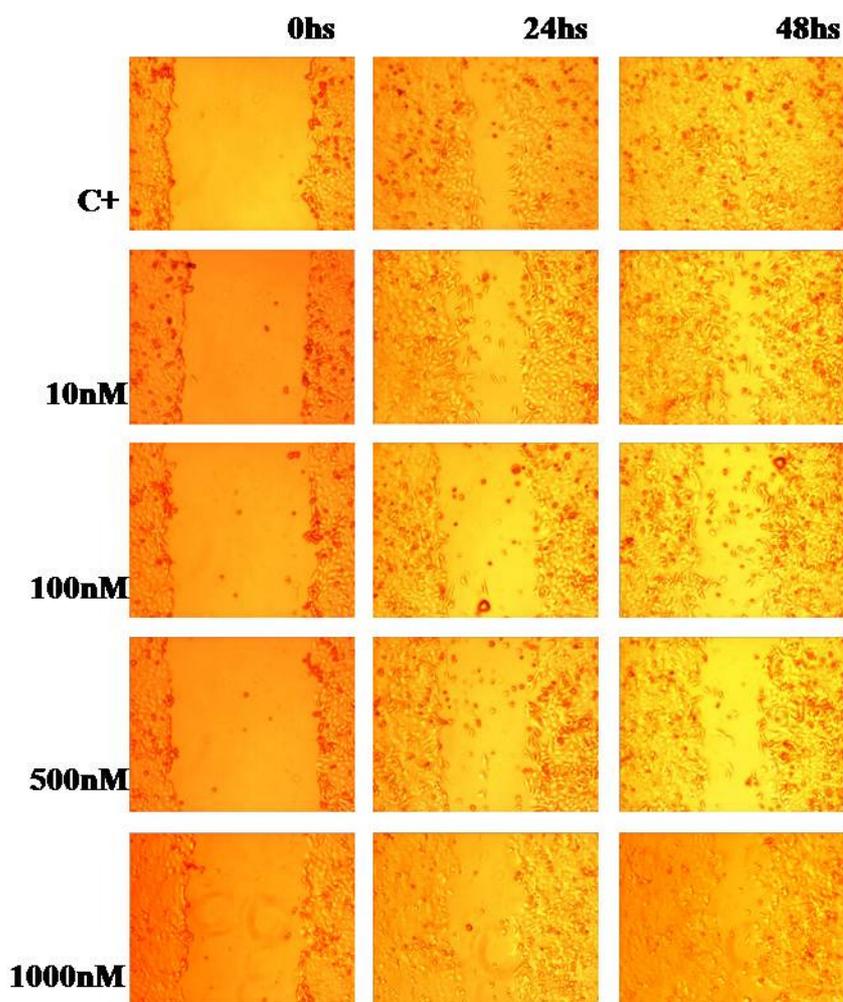
4.3.3 DU-145

A linhagem de câncer de próstata DU-145 foi a única a apresentar resultados estatisticamente significativos neste ensaio. A análise da área das feridas nos tempos de 0-24hs revelou, que apesar da tendência de inibição apenas a concentração de 1000 nM conseguiu inibir em 54% o fechamento da ferida sendo significativo em relação ao controle (figura 19).



**Figura 19. Inibição causada pela DisBa-01 no ensaio de *wound healing* no tempo de 0-24hs .**

A ferida foi feita em placas de 24 poços e as células incubadas com diversas concentrações da DisBa-01. Foram feitos três experimentos, em duplicata e a análise estatística foi feita utilizando ANOVA one-way e o teste de Tukey. Houve diferença estatística apenas na concentração de 1000 nM,  $**p<0,005$ .

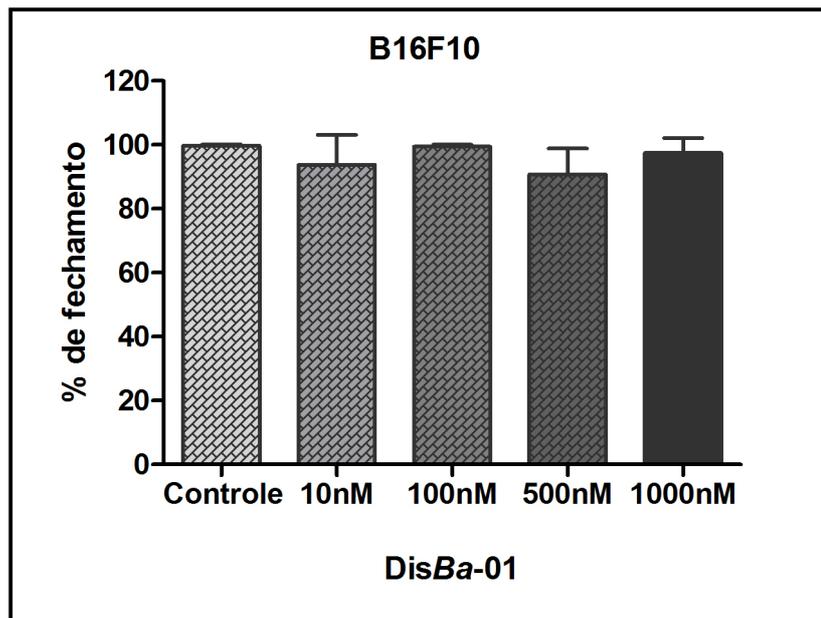


**Figura 20. Fotos do ensaio de *wound healing* na linhagem DU-145.**

As fotos são representativas de uma replicata dos ensaios nos tempos de 0, 24 e 48 horas após a realização das “feridas” nas concentrações de 10, 100, 500 e 1000 nM .

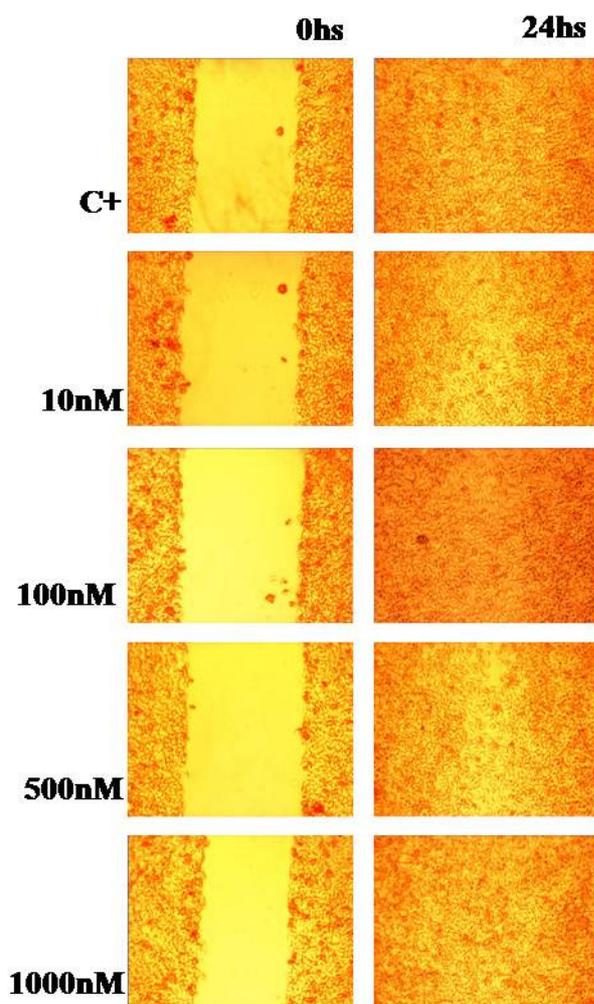
#### 4.3.4 B16F10

Experimentos com a linhagem de melanoma murino B16F10 foram realizadas utilizando o meio RPMI contendo 4% de soro, utilizada com o intuito de reduzir a taxa de proliferação da linhagem. As células de melanoma murino não responderam a incubação com a DisBa-01, em nenhuma das concentrações testadas (figura 21). Na figura 21 está uma das replicatas dos ensaios nos tempos de 0 e 24 horas.



**Figura 21.** Efeito da DisBa-01 sobre as células B16F10 em *wound healing*.

A ferida foi realizada e as células incubadas com diversas concentrações da DisBa-01. Foram realizados três experimentos em duplicata e a análise estatística foi feita utilizando ANOVA one-way e o teste de Tukey. Não houve diferença significativa entre as concentrações testadas e o controle no tempo de 0-24hs.



**Figura 22. Fotos do ensaio de *wound healing* com a linhagem murina B16F10.**

Fotos representativas de uma replicata dos ensaios de *wound healing* nos tempos de 0 e 24 horas após a realização das feridas. O ensaio foi realizado em meio contendo 4% de soro.

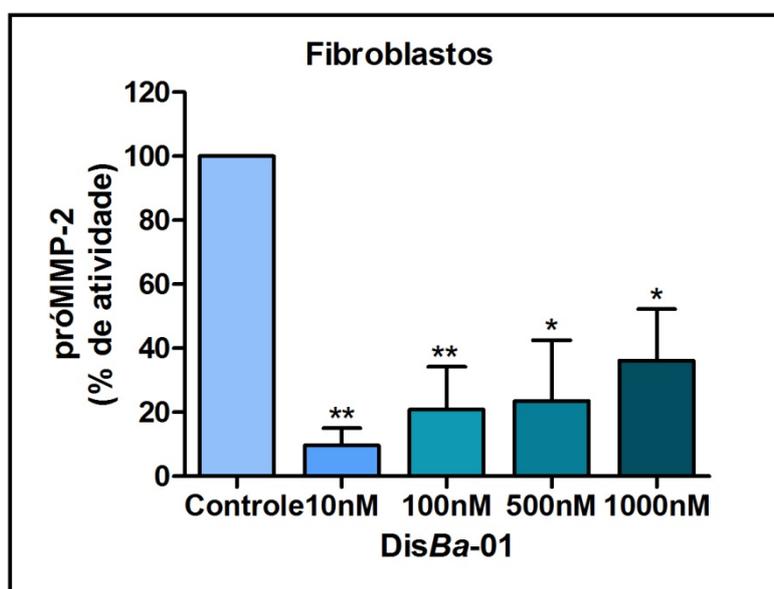
#### 4.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE METALOPROTEÍNASSE - ZIMOGRÁFIA

O sobrenadante dos ensaios de *wound healing* (na ausência de soro), foram submetidos a zimografia em gel de poliacrilamida contendo gelatina e a presença das bandas analisadas por densitometria.

Como mencionado na introdução, as MMPs observadas neste trabalho (MMP-2 e 9) são liberadas das células na sua forma inativa sendo ativadas no meio extracelular e assim, exercem sua atividade sobre as ligações peptídicas de outras enzimas e/ou proteínas. Nos géis de zimografia, essas enzimas são desnaturadas devido à presença de SDS, portanto as MMPs nas suas formas inativas também estão presentes como bandas nos géis (Hu e Beeton 2010).

4.4.1 Fibroblastos

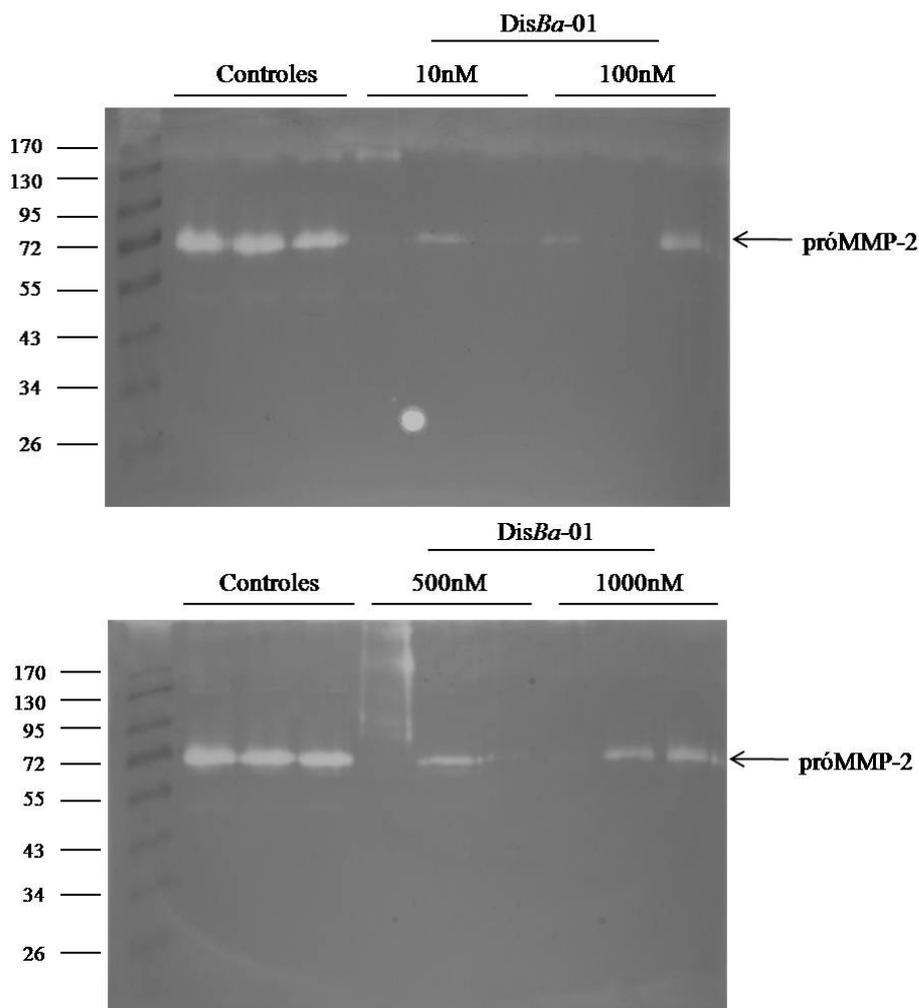
Na figura 23, verificou-se uma inibição significativa da próMMP 2, de aproximadamente 72 kDa, pela DisBa-01 nos fibroblastos humanos. Os géis indicaram ainda a presença de uma MMP, de aproximadamente 130 kDa, principalmente nos controles. Esta, provavelmente, é uma forma de dímero da MMP-9 ou um agregado com a TIMP-1 (figura 24). A inibição mais forte ocorreu na concentração de 10 nM, na qual a DisBa-01 inibiu em 90% a atividade da pró-MMP-2. Nas concentrações de 100, 500 e 1000 nM a inibição foi diminuindo para 79%, 76% e 64% respectivamente. Não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações testadas.



**Figura 23. Atividade da próMMP-2 em fibroblastos.**

Porcentagem da atividade proteolítica dos sobrenadantes do *wound healing* realizado na ausência de soro. Foi realizado um experimento em triplicata. A análise estatística foi feita utilizando ANOVA one-way e o teste de Tukey, \*\*p<0,004.

Na figura 24 podem-se observar as bandas apresentadas pelas replicatas. No primeiro gel a triplicata do controle e das concentrações de 10 e 100 nM e no segundo os mesmos controles foram aplicados para a comparação com as concentrações de 500 e 1000 nM.

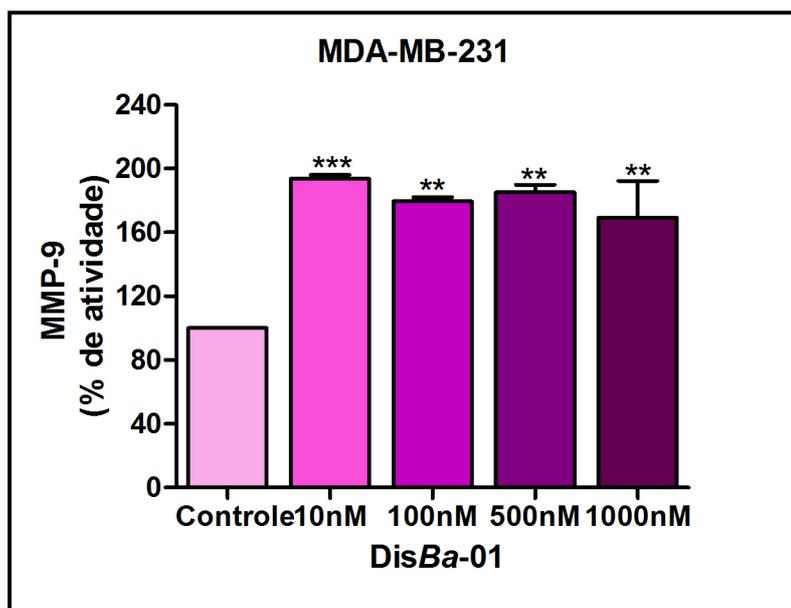


**Figura 24. Inibição da DisBa-01 na expressão da próMMP-2 em meio condicionado de fibroblastos em gel de zimografia.**

Após a confluência das células na placa de 12 poços, as “feridas” foram realizadas para o ensaio de wound healing e a DisBa-01, em diferentes concentrações, incubada com as células em meio sem soro por 24 horas. Os sobrenadantes foram então, preparados e aplicados ao gel de zimografia em gelatina. As triplicatas foram quantificadas e analisadas por densitometria.

#### 4.4.2 MDA-MB-231

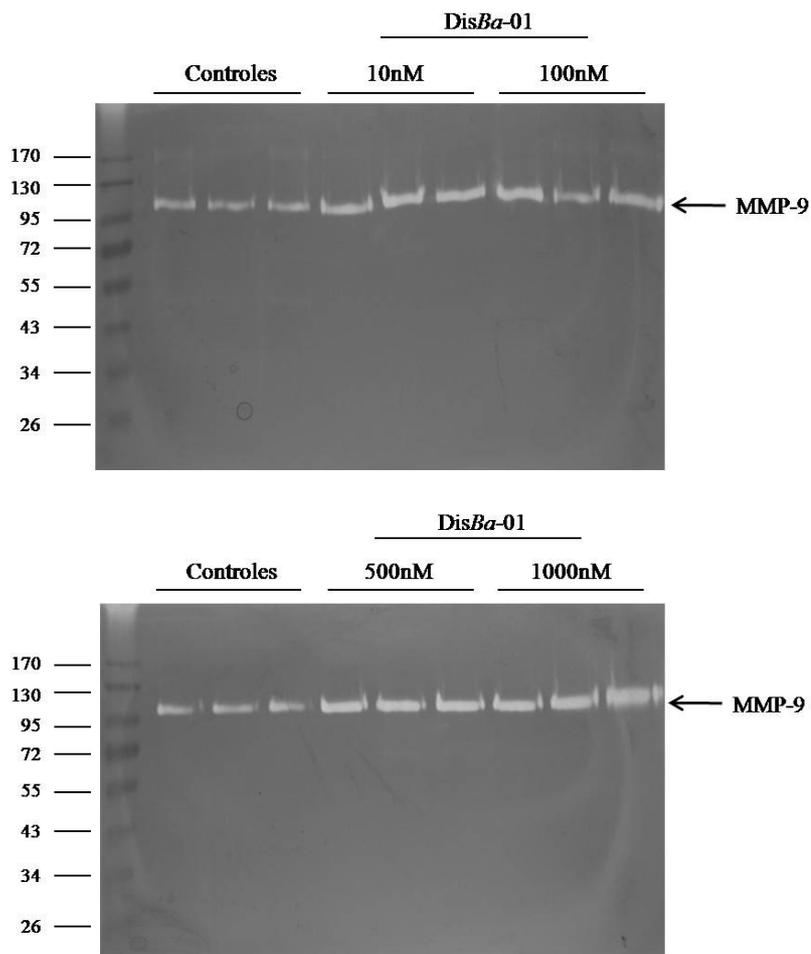
Como foi verificado na figura 25, a linhagem de câncer de mama apresentou uma expressão aumentada da MMP-9 quando incubada com a DisBa-01. Foi a única linhagem a ter um aumento significativo na expressão desta metalopeptidase, apesar de não ter apresentado um aumento na migração nos ensaios de *wound healing* (com soro) e de migração *transwell*, o qual, na verdade, teve sua migração inibida de forma significativa. Todas as concentrações apresentaram significância estatística entre os testes e o controle, mas sem apresentar diferenças entre as concentrações testadas.



**Figura 25. Análise quantitativa da MMP-9 da MDA-MB-231.**

Porcentagem da atividade proteolítica dos sobrenadantes do *wound healing* realizado na ausência de soro. Foi realizado um experimento em triplicata. A análise estatística foi feita utilizando ANOVA one-way e o teste de Tukey, \*\*\* $p < 0,0006$ .

O aumento da MMP foi de 93% para a concentração de 10 nM, 79% para 100 nM, 85% para 500 nM e 69% para 1000 nM. Nos géis (figura 26) observa-se a intensidade das bandas do sobrenadante do ensaio realizado em triplicata.

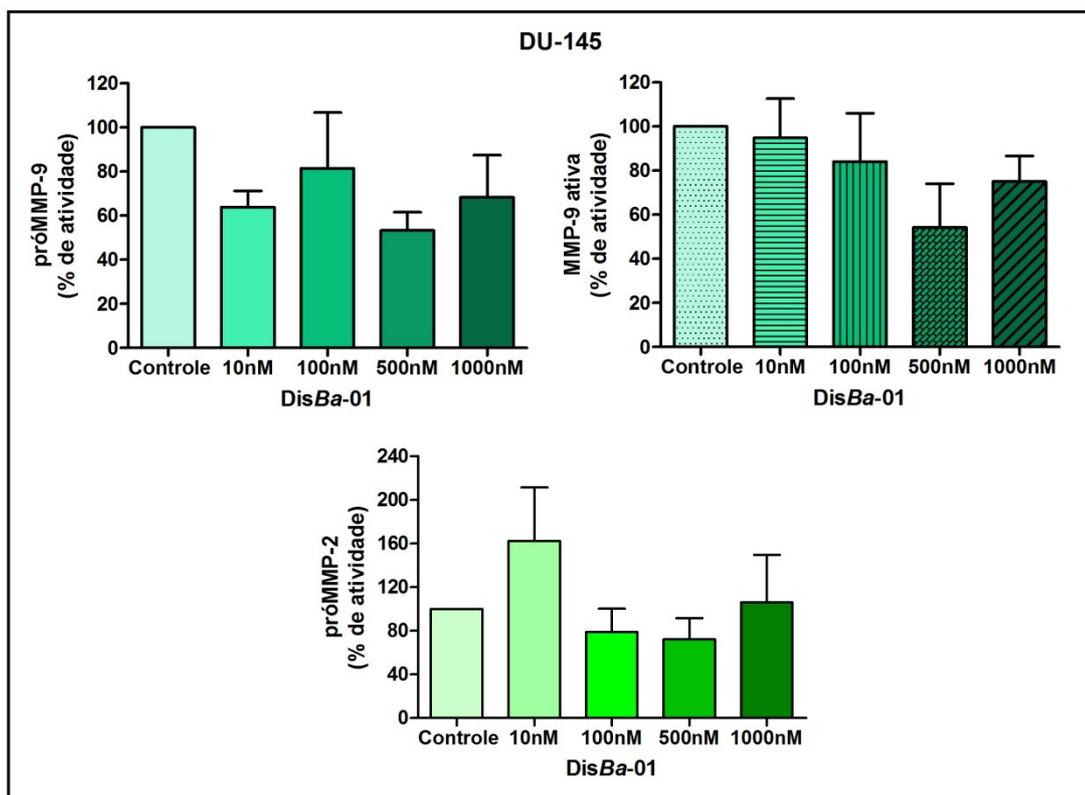


**Figura 26. Efeito da DisBa-01 sobre a expressão da MMP-9 em meio condicionado da MDA-MB-231 em gel de zimografia.**

Após a confluência das células na placa de 12 poços, as “feridas” foram realizadas para o ensaio de wound healing e a DisBa-01, em diferentes concentrações, incubada com as células em meio sem soro por 24 horas. Os sobrenadantes foram preparados e aplicados no gel de zimografia. As triplicatas foram quantificadas e analisadas por densitometria.

#### 4.4.3 DU-145

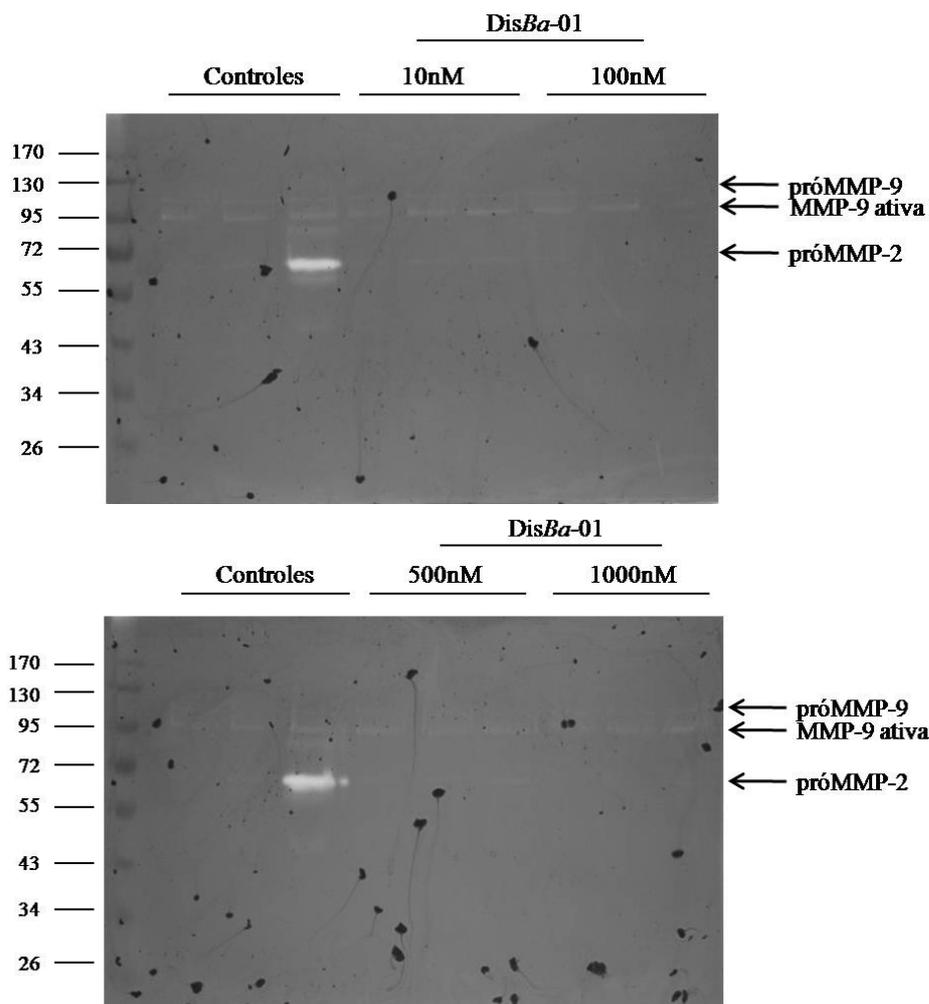
A figura 27 apresenta a análise das bandas detectadas nos geis. Foi verificada a presença das bandas indicando a presença das próMMP-9, MMP-9 ativa, e da próMMP-2. Nenhuma das concentrações apresentaram resultados estatisticamente significantes.



**Figura 27. Análise da atividade da MMP-9 e próMMP-2 da linhagem DU-145.**

Porcentagem da atividade proteolítica dos sobrenadantes do *wound healing* realizado na ausência de soro. Foi realizado um experimento em triplicata. A análise estatística indicou que não houve diferença entre as concentrações testadas da DisBa-01 e o controle.

Das linhagens utilizadas a DU-145 é a que induz a menor liberação de metalopeptidases. Foi a única linhagem deste trabalho que não apresentou resultados significativos na zimografia em *wound healing*.



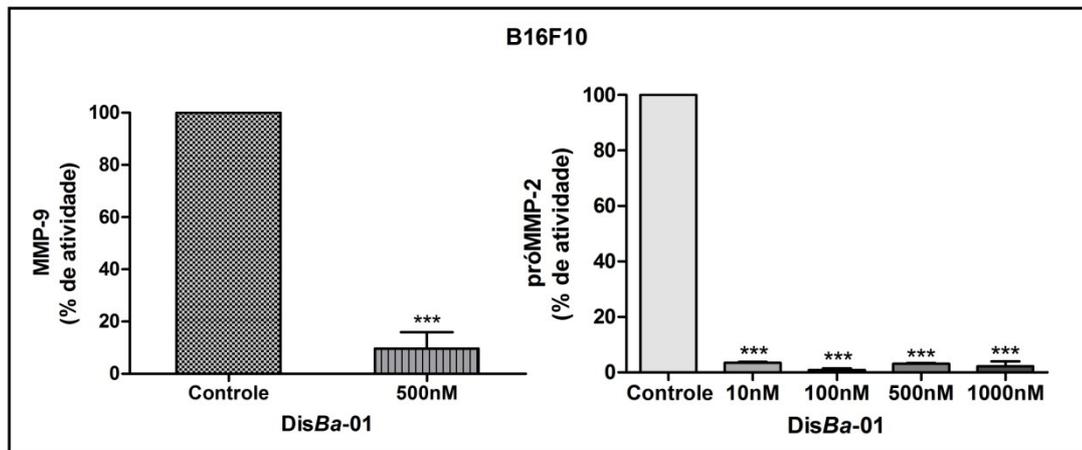
**Figura 28.** Efeito da DisBa-01 sobre expressão das próMMPs 9 e 2 e da MMP-9 ativa em meio condicionado de células DU-145.

Após a confluência das células na placa de 12 poços, as “feridas” foram realizadas e a DisBa-01, em diferentes concentrações, foi incubada com as células em meio sem soro por 24 horas. Os sobrenadantes foram então coletados, e preparados para serem aplicados ao gel de zimografia em gelatina. As triplicatas foram quantificadas e analisadas por densitometria.

#### 4.4.4 B16F10 – *Wound Healing*

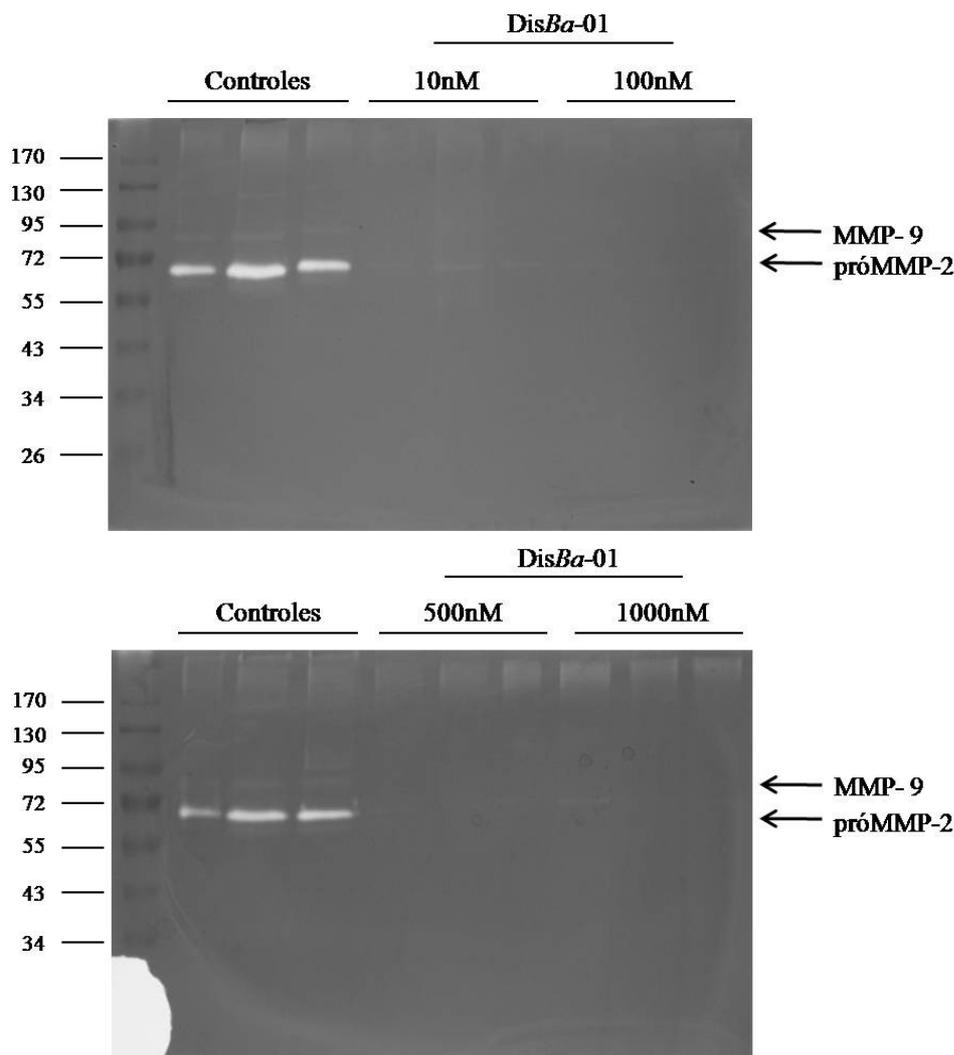
A DisBa-01 inibiu significativamente a expressão das MMP-9 e próMMP-2 das células de melanoma murino, submetidas ao *wound healing* na ausência de soro. No caso da MMP-9 a inibição foi tão intensa que as bandas relativas a mesma nas concentrações de 10, 100 e 1000 nM não foram detectadas no gel e na concentração de 500 nM a inibição foi de 90%. Enquanto a próMMP-2 foi inibida em 96% na concentração de 10 nM, 99% na concentração de 100 nM, 97% na de 500 nM e 98% na de 1000 nM. Nos géis (figura 30)

pode-se observar a presença das bandas em triplicata relativas ao controle e as relativas aos testes.



**Figura 29. Análise da atividade das MMP-9 e próMMP-2 nas células B16F10.**

Figura mostra em porcentagem a atividade proteolítica dos sobrenadantes do *wound healing* realizado na ausência de soro. Foi realizado um experimento em triplicata. A análise estatística foi feita utilizando ANOVA one-way e o teste de Tukey, \*\*\* $p < 0,0001$ .



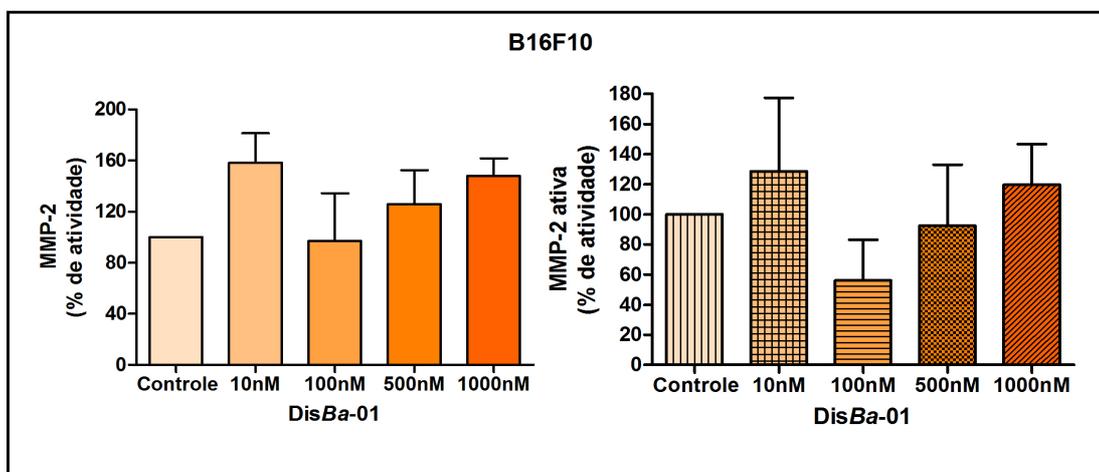
**Figura 30.** Efeito da expressão da próMMP-9 e 2 no meio condicionado de células B16F10 em gel de zimografia.

Após a confluência das células na placa de 12 poços, as “feridas” foram realizadas e a DisBa-01, em diferentes concentrações, foi incubada com as células em meio sem soro por 24 horas. Os sobrenadantes foram então coletados, e preparados para serem aplicados ao gel de zimografia em gelatina. As triplicatas foram quantificadas e analisadas por densitometria.

#### 4.4.5 B16F10 – Transwell

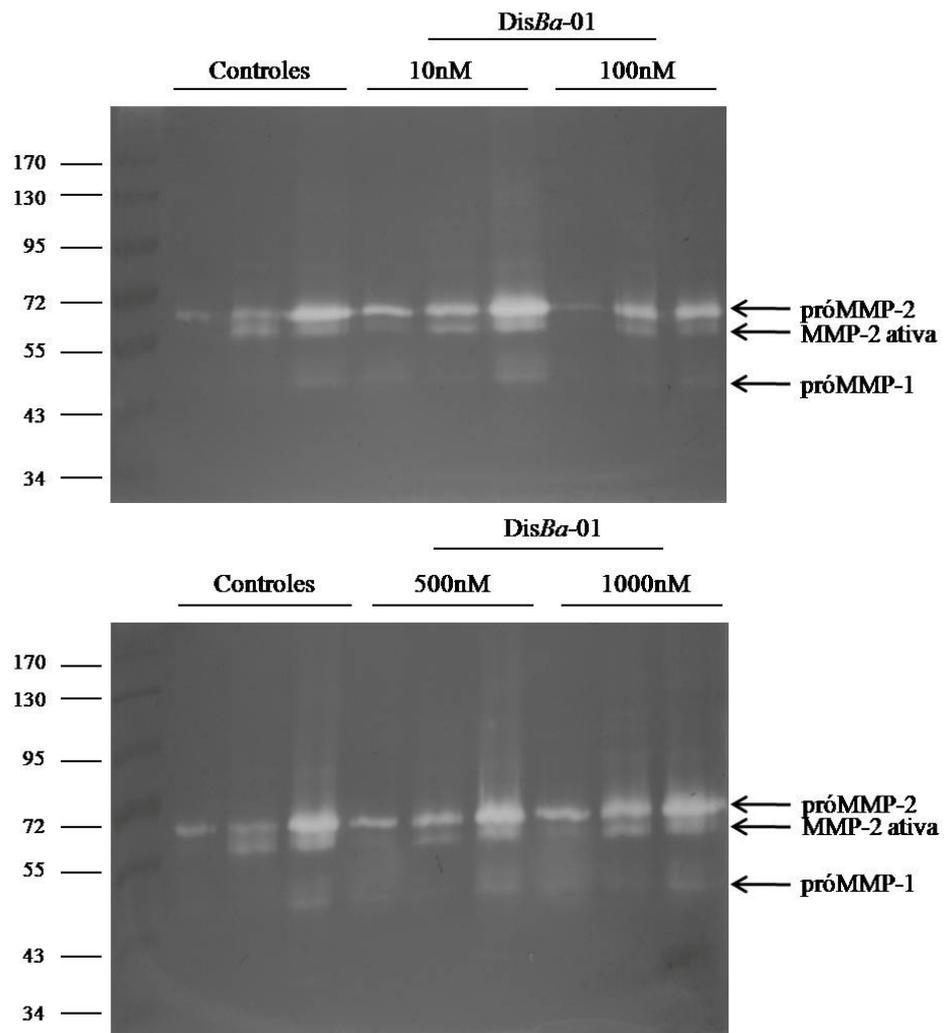
Na figura 31 observa-se a ação da DisBa-01 sobre as MMPs das células de melanoma murino, B16F10 no ensaio de migração *transwell*. Nenhuma das concentrações testadas levou a uma redução ou aumento das MMPs de forma significativa. O que vale ser ressaltado é que o perfil de expressão das MMPs foi alterado com relação ao ensaio de *wound healing*. Enquanto no *wound healing* houve a expressão das duas gelatinases, a MMP-2 e MM-9, no *transwell* houve a expressão apenas da MMP-2, entretanto esta foi expressa sob sua forma

inativa e ativa. Além disso, pode-se observar a presença de uma banda entre os marcadores de massa 43 e 55 kDa que provavelmente corresponde a MMP-1.



**Figura 31. Análise da zimografia das células B16F10 no ensaio *transwell*.**

As células foram adicionadas ao inserto em meio na ausência de soro e com a adição do meio condicionado como quimioatratante. Foram feitos três experimentos individuais. A análise estatística foi realizada através do ANOVA one-way seguido do teste de Tukey. Não houve diferença estatística entre as concentrações testadas da DisBa-01 e o controle.



**Figura 32. Efeito da DisBa-01 sobre a expressão das próMPPs 2 e 1 e MMP-2 ativa no meio coletado do ensaio transwell da B16F10.**

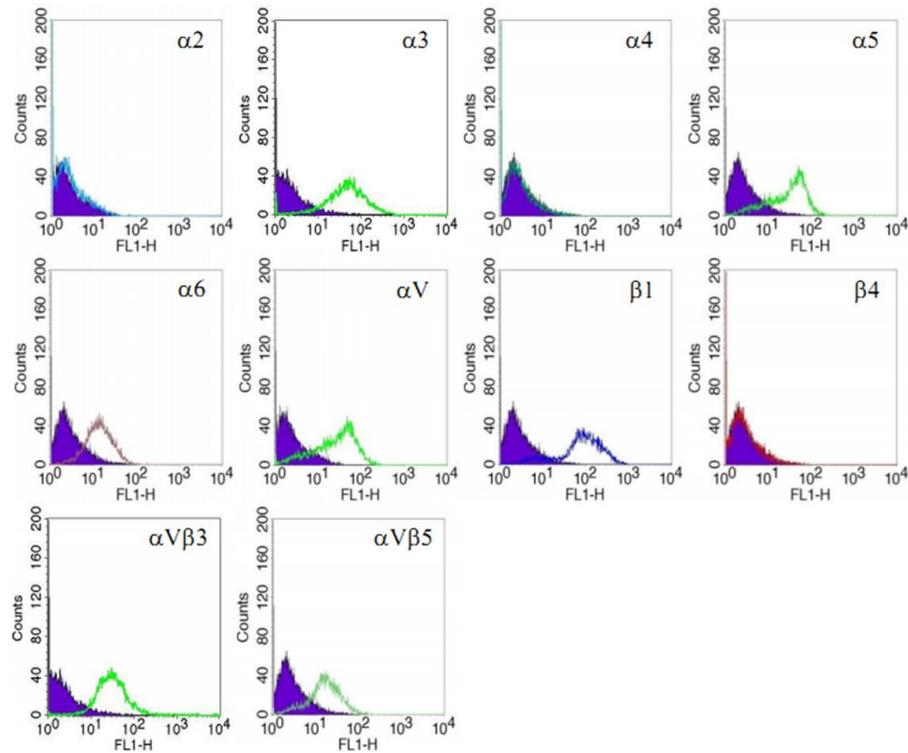
Os sobrenadantes das partes superiores dos insertos foram coletados, centrifugados, as amostras quantificadas e aplicadas ao gel. Cada banda do controle e das concentrações é representativa de um experimento. Os três ensaios individuais foram quantificados e analisados por densitometria.

### **5. DISCUSSÃO**

A metástase é a maior causa de morte em pacientes com câncer. Seu início se dá a partir do momento que células tumorais se desprendem do tumor primário e se direcionam ao seu sítio metastático. Durante esse evento inúmeros processos celulares são desencadeados, entre eles: adesão, migração, invasão e, após a adaptação ao sítio secundário, proliferação (Geiger e Peeper 2009; Yilmaz e Christofori 2010). O primeiro obstáculo ocorre durante a invasão, elas necessitam invadir tecidos vizinhos e atravessar a membrana basal para chegar a circulação. Para enfrentar esses desafios as células são auxiliadas por metalopeptidases que agem clivando moléculas de adesão celular e proteínas da MEC abrindo espaço para a passagem das células tumorais, além de produzir fatores que estimulam ainda mais a invasão. (Bourboulia e Stetler-Stevenson 2010; Radisky e Radisky 2010). Infelizmente, várias das etapas envolvidas na metástase não foram totalmente elucidadas, nos levando a crer, que ainda há um longo caminho para a descoberta de tratamentos eficazes.

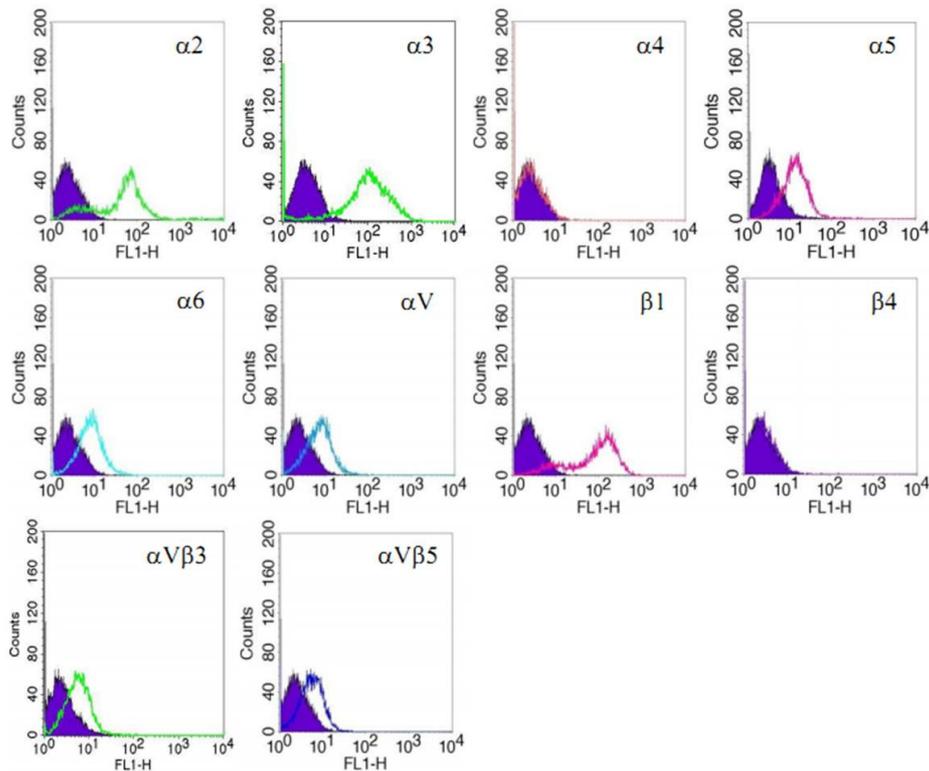
Neste trabalho, a DisBa-01, uma desintegrina RGD, foi capaz de inibir a migração, estimulada por soro, de fibroblastos, células de câncer de mama, MDA-MB-231 e câncer de próstata, DU-145. Esses resultados corroboram com estudos realizados envolvendo desintegrinas que apresentam motivo RGD. Estas, geralmente, são capazes de inibir a migração de células tumorais e endoteliais que possuem integrinas como a  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$  (receptores de vitronectina) e  $\alpha5\beta1$  (receptor de fibronectina). Através de citometria de fluxo realizada em nosso laboratório, foi analisada a expressão de integrinas em fibroblastos e MDA-MB-231. Nos fibroblastos, figura 33, foi verificada a presença das subunidades  $\alpha3$ ,  $\alpha5$ ,  $\alpha6$ ,  $\alpha\nu$  e  $\beta1$  e das interinas  $\alpha\nu\beta3$  e  $\alpha\nu\beta5$  (Ribeiro 2009, dados não publicados). Apesar de não ter sido detectada a presença da subunidade  $\alpha2$ , sabe-se que a integrina  $\alpha2\beta1$  é muito expressa em fibroblastos devido sua interação com o colágeno (Selistre-de-Araujo *et al.*, 2010). Na linhagem MDA-MB-231, figura 34, foi detectada a presença das subunidades  $\alpha2$ ,  $\alpha3$ ,  $\alpha5$ ,  $\alpha6$ ,  $\alpha\nu$  e  $\beta1$  e das integrinas  $\alpha\nu\beta3$  e  $\alpha\nu\beta5$  (Ribeiro 2009, dados não publicados). Enquanto que na linhagem DU-145, sabe-se que a integrina  $\alpha I I \beta 3$  tem sua expressão aumentada (Triakha *et al.*, 1998; Goel *et al.*, 2008). Em um estudo realizado por Yang e colaboradores de 2005 a desintegrina rhodostomina foi testada na migração de células de câncer de mama e próstata. A desintegrina inibiu fortemente e de maneira dose dependente a migração das células MDA-MB-231, MCF-7, e PC-3 nas concentrações de 1  $\mu\text{g/ml}$ , 3  $\mu\text{g/ml}$  e 10  $\mu\text{g/ml}$  (Yang *et al.*, 2005). Outra desintegrina RGD, a eristostatina, na concentração de 3  $\mu\text{M}$ , inibiu também a

migração de forma significativa, porém em células de melanoma humano (WM164, C8161, SBcl2, M24met, 1205Lu e MV3) (Tian *et al.*, 2007).



**Figura 33. Perfil de integrinas presentes na linhagem de Fibroblastos Humanos.**

As células foram incubadas com anticorpos primários específicos para as integrinas detectadas e em seguida incubadas com anticorpo secundário FITC-anti-IgG. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACScalibur - BD). A curva preenchida representa controle. Retirado de Ribeiro, 2009 (dados não publicados).



**Figura 34. Perfil de integrinas presentes na linhagem MDA-MB-231.**

As células foram incubadas com anticorpos primários específicos para as integrinas detectadas e em seguida incubadas com anticorpo secundário FITC-anti-IgG. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACScalibur - BD). A curva preenchida representa controle. Retirado de Ribeiro, 2009 (dados não publicados).

Podem ser citados ainda, estudos de invasão que adicionam uma cobertura (*coat*) de matrigel (matriz extracelular proveniente de um sarcoma de camundongo - Engelbreth-Holm-Swarm) sobre os insertos. Nesses ensaios, além dos movimentos migratórios as células necessitam utilizar MMPs para conseguir alcançar a parte inferior da membrana. A salmosina inibiu a invasão de células de melanoma B16F10 tendo utilizado bFGF (*basic fibroblast growth factor*) diluído em meio como quimioatraente. A salmosina utilizada na concentração de 10 e 20  $\mu\text{g/ml}$  inibiu em 80-90% a invasão dessas células (Kang *et al.*, 2000). A desintegrina dimérica contortrostatina, também foi utilizada em um ensaio de invasão (com a adição de *coat* de matrigel) com células MDA-MB-435 utilizando meio condicionado de células de fibrosarcoma (HT-1080) como quimioatraente. Foi observada forte inibição de maneira dose dependente para as concentrações de 10, 100 e 1000 nM (Zhou *et al.*, 2000). Um peptídeo sintético cíclico possuindo o motivo RGD também foi testado em ensaios de invasão com células de câncer de mama, MDA-MB-231 e MCF-7. O quimioatraente utilizado foi o meio condicionado de fibroblastos murinos NIH3T3 e a concentração do peptídeo foi de 150  $\mu\text{M}$  (Yang *et al.*, 2006). A saxatilina na concentração de 50 nM inibiu a invasão de

células de câncer de ovário, MDAH 2774 em mais de 80% utilizando o meio com soro e TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) como quimioatraente (Kim *et al.*, 2007).

A inibição da migração dos fibroblastos, das células MDA-MB-231 e DU-145 no ensaio *transwell* indicam a capacidade da DisBa-01 de agir sobre o processo migratório de células normais e linhagens tumorais corroborando com os estudos citados. Apesar dos fibroblastos serem células normais está comprovado o envolvimento de uma subpopulação, os miofibroblastos, formando agregados com células tumorais na circulação durante o processo metastático (Duda *et al.*, 2010). Portanto estudos posteriores poderiam verificar a ação da DisBa-01 sobre a migração dessa subpopulação de miofibroblastos.

No ensaio de migração *transwell* com a linhagem B16F10, a DisBa-01 não foi capaz de inibir a migração dessas células em direção ao meio condicionado de fibroblastos. No entanto, essa linhagem foi escolhida por possuir grande quantidade de integrina  $\alpha\beta 3$  (Kang *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2008), principal alvo da DisBa-01. A ausência de inibição nesse ensaio, pode estar relacionada a composição do meio condicionado, no qual diversos fatores de crescimento estão presentes, entre eles alguns membros da família FGF (*fibroblast growth factor*), TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ), HGF (*hepatocyte growth factor*), IGF (*insulin-like growth factor*), MMPs e EGF (*epithelial growth factor*) (Bhowmick *et al.*, 2004). É possível hipotetizar que o meio condicionado tenha alterado o perfil de integrinas presentes nas células e diminuído a quantidade da  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha 5\beta 1$  e  $\alpha\beta 5$  (Klein *et al.*, 1993; Sakamoto *et al.*, 2008). Além disso, alguns fatores de crescimento que estão presentes no meio tem afinidade pela integrina  $\alpha\beta 3$  podendo impedir ou deslocar sua ligação com a DisBa-01. O FGF1 (*fibroblast growth factor 1*) é um fator que se liga especificamente a integrina  $\alpha\beta 3$ , interagindo com a mesma afinidade e ocupando o mesmo sítio de ligação de outros ligantes, ele pode ainda, ao mesmo tempo, interagir com seu receptor FGFR uma vez que possui um sítio diferente de ligação a ele (Mori *et al.*, 2008). Outro fator da mesma família, o FGF-2 (*basic fibroblast growth factor 2*) também é capaz de se ligar a integrina  $\alpha\beta 3$  em células endoteliais GM 7373 inibindo sua adesão a vitronectina (Rusnati *et al.*, 1997).

O *wound healing* é um ensaio de migração que consiste na quantificação do preenchimento celular da área de uma ferida realizada com o auxílio de uma ponteira, em um poço com células confluentes (Yue *et al.*, 2010). As células localizadas nas bordas da ferida são polarizadas e migram em conjunto na direção da borda oposta, na tentativa de fechar o espaço vazio (Friedl e Gilmour 2009). É um ensaio que pode ser utilizado para o estudo da angiogênese, metástase, resposta imune e mecanismos relacionados a migração como

polarização celular, remodelamento da matriz e do citoesqueleto. O baixo custo que envolve sua realização permite ainda a ampla utilização deste como ferramenta de testes para novas moléculas (Yarrow *et al.*, 2004; Yue *et al.*, 2010).

Nos ensaios de *wound healing* realizados com a DisBa-01 nenhuma das linhagens, com exceção da concentração de 1000 nM da linhagem DU-145, apresentaram resultados significativos. Como a concentração máxima testada foi de 1000 nM é possível que a DisBa-01 necessite de concentrações maiores ou menores para que haja efeito significativo, ou ainda a realização de mais replicatas já que o erro encontrado foi um pouco elevado. Esses resultados são diferentes dos normalmente obtidos por outras desintegrinas, como demonstrado pelas células de carcinoma de bexiga que tiveram sua migração inibida através da atividade da desintegrina colombistatina com um IC<sub>50</sub> de 1.8 µM (Sánchez *et al.*, 2009). A desintegrina crotatoxin 2 inibiu também a migração de células de câncer de mama murino 66.3p em 63% utilizando 10µg da desintegrina. Os autores ressaltam ainda a possibilidade do envolvimento das subunidades αv, β1 e integrina α<sub>IIb</sub>β3 na migração e colonização da metástase tumoral (Galán *et al.*, 2008).

Os ensaios para a detecção de metalopeptidases foram realizados através de zimografia em géis de poliacrilamida contendo gelatina, técnica que permite a identificação das MMP-2 e 9, e em menor intensidade, da MMP-1. As metalopeptidases atuam clivando componentes da matriz extracelular (Hu e Beeton 2010) abrindo espaço por entre as fibras da MEC para o crescimento tumoral, angiogênese e metástase. As MMP-1 e 2 estão envolvida principalmente com a invasão tecidual enquanto a 9 está ligada à angiogênese (Kessenbrock *et al.*, 2010).

Estudos realizados por Kim *et al.*, 2007 constataram a ação da saxatilina sobre a diminuição da expressão de MMP-9 em células de câncer de ovário (Kim *et al.*, 2007). Entretanto a mesma atividade não foi verificada em HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) com a desintegrina contortrostatin, onde foram utilizadas concentrações de até 1000 nM, porém sem efeito sobre a expressão das MMP-2 e 9 (Golubkov *et al.*, 2003). Os dados acima corroboram com resultados obtidos pelos fibroblastos e células de melanoma murino que tiveram a atividade da MMP-2 e das MMP-2 e 9 diminuída, respectivamente, enquanto que nas células câncer de próstata as expressões foram inalteradas.

A atividade da próMMP-2 em fibroblastos apresentaram uma resposta na qual as menores doses causaram os maiores efeitos. Segundo Reynolds 2010, a curva dose-resposta de peptídeos com motivo RGD possui a forma de sino, o que nos leva a crer que estes

resultados estejam localizados na parte decrescente da curva, indicando a necessidade da utilização de doses menores para essa linhagem (Reynolds 2010).

No início das pesquisas sobre desintegrinas, elas eram consideradas moléculas bloqueadoras de integrinas, entretanto, atualmente, sua atividade como moduladora destes receptores está bem consolidada (Golubkov *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2007). Desse modo, diferentes resultados podem ser observados quando diferentes desintegrinas e tipos celulares são utilizados. No caso da linhagem MDA-MB-231, a ação moduladora da DisBa-01 levou ao aumento da atividade da MMP-9. Zigrino *et al.*, (2007) clonaram apenas os domínios tipo-desintegrina e rico em cisteína da ADAM9 (*a desintegrin and metalloprotease*), que apesar de ser uma proteína com motivo ECD, estimulou a expressão da MMP-9 em queratinócitos humanos (Zigrino *et al.*, 2007).

A zimografia do ensaio *transwell* com a linhagem B16F10 não gerou resultados significativos, porém é interessante notar os perfis de expressão induzidos pelos diferentes tipos de ensaios. No *transwell*, pode-se notar a expressão das próMMP-2 e MMP-2 ativa, além de indícios da presença da MMP-1, enquanto no *wound healing* é possível verificar as MMPs 2 e 9, porém sem a presença de bandas das formas ativas.

Os gráficos apresentados pelas figuras 25 e 29, referentes à quantificação dos géis das células MDA-MB-231 e B16F10, demonstram que as repostas apresentadas pelas MMPs não foram dose-dependente, havendo praticamente a mesma resposta para todas as concentrações testadas. Citando novamente Reynolds 2010, a mesma teoria da curva em sino poderia ser utilizada. A justificativa é que a DisBa-01 estaria desencadeando a resposta máxima das células, o que significa que as doses testadas estariam localizadas no ápice da curva (Reynolds 2010).

Como mostra a tabela 3, a DisBa-01 teve alguns resultados diferentes do esperado. Além da ausência de resultados significativos no *wound healing* e em algumas linhagens na zimografia, ela estimulou a expressão da próMMP-9 na linhagem MDA-MB-231. A DisBa-01 possui o motivo RGD, que apesar de se ligar preferencialmente as integrinas  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$  e  $\alpha5\beta1$ , é considerado promíscuo e pode interagir com diferentes integrinas. Essas diferentes interações resultam na ativação de diferentes vias de sinalização e, conseqüentemente, repostas celulares.

Tabela 3. Resumo dos resultados obtidos.

Células	<i>Transwell</i>	<i>Wound Healing</i>	(pró)MMP-2	MMP-9
<b>Fibroblastos</b>	↓	-	↓	-
<b>MDA-MB-231</b>	↓	-	-	↑
<b>DU-145</b>	↓	↓	-	-
<b>B16F10</b>	-	-	↓	↓

### **6. CONCLUSÃO**

A DisBa-01 age modulando as respostas celulares, nos levando a crer que ela poderia ser utilizada como instrumento de pesquisa, para elucidação de mecanismos relacionados as integrinas e processos migratórios, assim como servir de base para o planejamento racional de novas drogas, que atuem na terapia anti-metastática.

Entretanto, é necessário que haja uma maior investigação com relação aos seus efeitos sobre os fibroblastos, pois apesar deles estarem envolvidos no crescimento tumoral e metastático, são células normais, que estão distribuídas por todas as partes do corpo.

### 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINI, A.; BENELLI, R. The chemoinvasion assay: a method to assess tumor and endothelial cell invasion and its modulation. **Nat Protoc**, v. 2, n. 3, p. 504-511, 2007.

ALPHONSO, A.; ALAHARI, S. K. Stromal cells and integrins: conforming to the needs of the tumor microenvironment. **Neoplasia**, v. 11, n. 12, p. 1264-1271, 2009.

BARCZYK, M. *et al.* Integrins. **Cell Tissue Res**, v. 339, n. 1, p. 269-280, 2010.

BHOWMICK, N. A. *et al.* Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 332-337, 2004.

BOURBOULIA, D.; STETLER-STEVENSON, W. G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Semin Cancer Biol**, v.20, p.161-168, 2010.

BROWN, M. C. *et al.* Angiostatic activity of obtustatin as alpha1beta1 integrin inhibitor in experimental melanoma growth. **Int J Cancer**, v.123, n.9, p.2195-2203, 2008.

CALVETE, J. J. *et al.* Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v.45, n.8, p.1063-1074. 2005.

CARDOSO, K. C. *et al.* A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). **BMC Genomics**, v.11, p.605, 2010.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. **Science**, v.331, n.6024, p.1559-1564, 2011.

CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends Cell Biol**, v.11, n.11, p.S37-43, 2001.

CHRISTIANSEN, J. J.; RAJASEKARAN, A. K. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. **Cancer Res**, v.66, n.17, p.8319-8326, 2006.

CIDADE, D. A. *et al.* Bothrops jararaca venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. **Toxicon**, v.48, n.4, p.437-461, 2006.

CLEUTJENS, J. P. *et al.* Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. **J Mol Cell Cardiol**, v.27, n.6, p.1281-1292, 1995.

COELHO, A. L. *et al.* RGD- and MLD-disintegrins, jarastatin and EC3, activate integrin-mediated signaling modulating the human neutrophils chemotaxis, apoptosis and IL-8 gene expression. **Exp Cell Res**, v.292, n.2, p.371-384, 2004.

CHIANG, H. S.; SWAIM, M. W.; HUANG, T. F. Characterization of platelet aggregation induced by human colon adenocarcinoma cells and its inhibition by snake venom peptides, trigramin and rhodostomin. **Br J Haematol**, v. 87, n. 2, p. 325-31, Jun 1994.

DELLA-CASA, M. S *et al.* Insularin, a disintegrin from *Bothrops insularis* venom: inhibition of platelet aggregation and endothelial cell adhesion by the native and recombinant GST-insularin proteins. **Toxicon**, v.57, n.1, p.125-133, 2011.

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

EBLE, J. A. Matrix biology meets toxinology. **Matrix Biol**, v.29, n.4, p.239-247, 2010.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, v.2, n.3, p.161-174, 2002.

FENWICK, A. M. *et al.* Morphological and Molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis* and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae) **Zool. J. Linn.** v.156, p.617-640, 2009.

FOKAS, E. *et al.* Metastasis: the seed and soil theory gains identity. **Cancer Metastasis Rev**, v.26, n.3-4, p.705-715, 2007.

FORGET, M. A. *et al.* Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis. **Can J Physiol Pharmacol**, v.77, n.7, p.465-480, 1999.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v.45, n.8, p.969-985, 2005.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS J**, v.275, n.12, p.3016-3030, 2008.

FRANCAVILLA, C. *et al.* The functional role of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis. **Semin Cancer Biol**, v.19, n.5, p.298-309, 2009.

FRIEDL, P.; BRÖCKER, E. B. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. **Cell Mol Life Sci**, v.57 n.1, p.41-64, 2000.

FRIEDL, P.; GILMOUR, D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.10, n.7, p.445-457, 2009.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. **Nat Rev Cancer**, v.3, n.5, p.362-374, 2003.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. **J Cell Biol**, v.188, n.1, p.11-19, 2010.

GALÁN, J. A. *et al.* Inhibition of lung tumor colonization and cell migration with the disintegrin crotatroxin 2 isolated from the venom of *Crotalus atrox*. **Toxicon**, v.51, n.7, p.1186-1196, 2008.

GAN, Z. R. *et al.* Echistatin. A potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper, *Echis carinatus*. **J Biol Chem**, v.263, n.36, p.19827-19832, 1988.

GAY, C. C. *et al.* Systemic alterations induced by a *Bothrops alternatus* hemorrhagic metalloproteinase (baltergin) in mice. **Toxicon**, v.53, n.1, p.53-59, 2009.

GEIGER, T. R.; PEEPER D. S. Metastasis mechanisms. **Biochim Biophys Acta**, v.1796, n.2, p.293-308, 2009.

GOEL, H. L. *et al.* Integrins in prostate cancer progression. **Endocr Relat Cancer**, v.15, n.3, p.657-664, 2008.

GOLUBKOV, V. *et al.* Anti-angiogenic activity of contortrostatin, a disintegrin from Agkistrodon contortrix contortrix snake venom. **Angiogenesis**, v.6, n.3, p.213-224, 2003.

GOULD, R. J. *et al.* Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.195, n.2, p.168-171, 1990.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v.82, n.9-10, p.841-850, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, n.5, p.646-674, 2011.

HARBURGER, D. S.; CALDERWOOD, D. A. Integrin signalling at a glance. **J Cell Sci**, v.122, n.Pt 2, p.159-163, 2009.

HILLEN, F.; GRIFFIOEN, A. W. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. **Cancer Metastasis Rev**, v.26, n.3-4, p.489-502, 2007.

HIRAYAMA, S. N. S. Análise do transcriptoma da glândula venenífera de *Rinocerophis alternatus* (*Bothrops alternatus*), Universidade Federal de São Carlos, 2011.

HONG, S. Y. *et al.* The snake venom disintegrin salmosin induces apoptosis by disassembly of focal adhesions in bovine capillary endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.302, n.3, p.502-508, 2003.

HU, X.; BEETON C. Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography. **J Vis Exp**, n.45, 2010.

HUANG, T. F. *et al.* Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. **J Biol Chem**, v.262, n.33, p.16157-16163, 1987.

HYNES, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. **Science**, v.326, n.5957, p.1216-1219, 2009.

JANG, Y. J. *et al.* Saxatilin suppresses tumor-induced angiogenesis by regulating VEGF expression in NCI-H460 human lung cancer cells. **J Biochem Mol Biol**, v.40, n.3, p.439-443, 2007.

JOYCE, J. A.; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nat Rev Cancer**, v.9, n.4, p.239-252, 2009.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nat Rev Cancer**, v.6, n.5, p.392-401, 2006.

KAMIGUTI, A. S. *et al.* Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v.34, n.6, p.627-642, 1996.

KANG, I. C. *et al.* Suppressive mechanism of salmosin, a novel disintegrin in B16 melanoma cell metastasis. **Biochem Biophys Res Commun**, v.275, n.1, p.169-173, 2000.

KAUSKOT, A. *et al.* Hemostatic effects of recombinant DisBa-01, a disintegrin from *Bothrops alternatus*. **Front Biosci**, v.13, p.6604-6616, 2008.

KESSENBROCK, K. *et al.* Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v.141, n.1, p.52-67, 2010.

KIM, D. S. *et al.* Saxatilin, a snake venom disintegrin, suppresses TNF-alpha-induced ovarian cancer cell invasion. **J Biochem Mol Biol**, v.40, n.2, p.290-294, 2007.

KIM, D. S. *et al.* Integrin alphavbeta3-mediated transcriptional regulation of TIMP-1 in a human ovarian cancer cell line. **Biochem Biophys Res Commun**, v.377, n.2, p.479-483, 2008.

KIM, S. H. *et al.* Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. **J Endocrinol**, v.209, n.2, p.139-151, 2011.

KLEIN, S. *et al.* Basic fibroblast growth factor modulates integrin expression in microvascular endothelial cells. **Mol Biol Cell**, v.4, n.10, p.973-982, 1993.

KOH, C. Y.; KINI, R. M. From snake venom toxins to therapeutics - Cardiovascular examples." **Toxicon**, v.30, p.1-10, 2011.

LEE, H. O. *et al.* FAP-overexpressing fibroblasts produce an extracellular matrix that enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells. **BMC Cancer**, v.11, n.1, p.245, 2011.

LI, L. *et al.* The invasive potential of human melanoma cell lines correlates with their ability to alter fibroblast gene expression in vitro and the stromal microenvironment in vivo. **Int J Cancer**, v.125, n.8, p.1796-1804, 2009.

LINDER, S. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. **Trends Cell Biol**, v.14, n.3, p.107-117, 2007.

LU, X. *et al.* ADAM proteins - therapeutic potential in cancer. **Curr Cancer Drug Targets**, v.8, n.8, p.720-732, 2008.

LUO, Y. *et al.* Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer. **J Clin Invest**, v.116, n.8, p.2132-2141, 2006.

MARQUETI, R. C. *et al.* Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effects of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. **Eur J Appl Physiol**, v.104, n.6, p.1087-1093, 2008.

- MAS-MORUNO, C. *et al.* Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. **Anticancer Agents Med Chem**, v.10, n.10, p.753-768, 2010.
- MCLANE, M. A. *et al.* Viper venom disintegrins and related molecules. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.219, n.2, p.109-119, 1998.
- MOISEEVA, N. *et al.* Structure of acostatin, a dimeric disintegrin from Southern copperhead (*Agkistrodon contortrix contortrix*), at 1.7 Å resolution. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v.64, n.Pt 4, p.466-470, 2008.
- MORI, S. *et al.* Direct binding of integrin  $\alpha v\beta 3$  to FGF1 plays a role in FGF1 signaling. **J Biol Chem**, v.283, n.26, p.18066-18075, 2008.
- MOSER, M. *et al.* The tail of integrins, talin, and kindlins. **Science**, v.324, n.5929, p.895-899, 2009.
- NETO, E. H., *et al.* Activation of human T lymphocytes via integrin signaling induced by RGD-disintegrins. **Biochim Biophys Acta**, v.1773, n.2, p.176-184, 2007.
- OLIVA, I. B. *et al.* Effect of RGD-disintegrins on melanoma cell growth and metastasis: involvement of the actin cytoskeleton, FAK and c-Fos. **Toxicon**, v.50, n.8, p.1053-1063, 2007.
- PERRET, G. Y.; CREPIN, M. New pharmacological strategies against metastatic spread. **Fundam Clin Pharmacol**, v.22, n.5, p.465-492, 2008.
- PERRET, G. Y.; CRÉPIN, M. New pharmacological strategies against metastatic spread. **Fundam Clin Pharmacol**, v.22, n.5, p.465-492, 2008.
- QUEIROZ, G. P. *et al.* Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v.52, n.8, p.842-851, 2008.

RADISKY, E. S.; RADISKY, D. C. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v.15, n.2, p.201-212, 2010.

RAMOS, O. H. *et al.* A novel alpha(v)beta (3)-blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. **Clin Exp Metastasis**, v.25, n.1, p.53-64, 2008.

RAMOS, O. H.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Snake venom metalloproteases--structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v.142, n.3-4, p.328-346, 2006.

RATHINAM, R.; ALAHARI, S. K. Important role of integrins in the cancer biology. **Cancer Metastasis Rev**, v.29, n.1, p.223-237, 2010.

REYNOLDS, A. R. Potencial relevance of bell-shaped and u-shaped dose-responses for the therapeutic targeting of angiogenesis in cancer. **Dose-Response**, v.8, p.253-284, 2010.

RIBEIRO, J. U. Efeitos das Desintegrinas Alternagin-C e DisBa-01 de *Bothrops alternatus*, em fibroblastos, células endoteliais e tumorais. **Universidade Federal de São Carlos**, 2009 (dados não publicados).

RUSNATI, M. *et al.* Alphavbeta3 integrin mediates the cell-adhesive capacity and biological activity of basic fibroblast growth factor (FGF-2) in cultured endothelial cells. **Mol Biol Cell**, v.8, n.12, p.2449-2461, 1997.

RØRTH, P. Collective cell migration. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.25, p.407-429, 2009.

SAKAMOTO, S. *et al.* Targeting vasculature in urologic tumors: mechanistic and therapeutic significance. **J Cell Biochem**, v.103, n.3, p.691-708, 2008.

SCHMIDT, S.; FRIEDL, P. Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. **Cell Tissue Res**, v.339, n.1, p.83-92, 2010.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. *et al.* Alternagin-C, a disintegrin-like protein from the venom of *Bothrops alternatus*, modulates alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation. **Braz J Med Biol Res**, v.38, n.10, p.1505-1511, 2005.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. *et al.* Snake Venom Disintegrins and Cell Migration. **Toxins**, v.0, n.2, p.2606-2621, 2010.

SHATTIL, S. J. *et al.* The final steps of integrin activation: the end game. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.11, n.4, p.288-300, 2010.

SHEU, J. R. *et al.* Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti-alpha(v)beta3 integrin monoclonal antibody. **Biochim Biophys Acta**, v.1336, n.3, p.445-454, 1997.

STRATTON, M. R. *et al.* The cancer genome. **Nature**, v.458, n.7239, p.719-724, 2009.

SÁNCHEZ, E. E. *et al.* Colombistatin: a disintegrin isolated from the venom of the South American snake (*Bothrops colombiensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion. **Arch Toxicol**, v.83, n.3, p.271-279, 2009.

TEIXEIRA, C. e. F. *et al.* Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100(Suppl. L), p.181-184, 2005.

TIAN, J. *et al.* Inhibition of melanoma cell motility by the snake venom disintegrin eristostatin. **Toxicon**, v.49, n.7, p.899-908, 2007.

TONINI, T. *et al.* Molecular basis of angiogenesis and cancer. **Oncogene**, v.22, n.42, p.6549-6556, 2003.

VARTAK, D. G. *et al.* In vitro evaluation of functional interaction of integrin alphavbeta3 and matrix metalloprotease-2. **Mol Pharm**, v.6, n.6, p.1856-1867, 2009.

WORTHLEY, D. L. *et al.* The extracellular matrix in digestive cancer. **Cancer Microenviron**, v.3, n.1, p.177-185, 2010.

WU, W. B. *et al.* Disintegrin causes proteolysis of beta-catenin and apoptosis of endothelial cells. Involvement of cell-cell and cell-ECM interactions in regulating cell viability. **Exp Cell Res**, v.286, n.1, p.115-127, 2003.

YAMAGUCHI, H. *et al.* Cell migration in tumors. **Curr Opin Cell Biol**, v.17, n.5, p.559-564, 2005.

YANG, R. S. *et al.* Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin. **Toxicon**, v.45, n.5, p.661-669, 2005.

YANG, W. *et al.* Inhibition of proliferative and invasive capacities of breast cancer cells by arginine-glycine-aspartic acid peptide in vitro. **Oncol Rep**, v.15, n.1, p.113-117, 2006.

YARROW, J. C. *et al.* A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. **BMC Biotechnol**, v.4, n.21, 2004.

YEH, C. H. *et al.* Accutin, a new disintegrin, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo by acting as integrin  $\alpha v\beta 3$  antagonist and inducing apoptosis. **Blood**, v.92, n.9, p.3268-3276, 1998.

YILMAZ, M.; CHRISTOFORI, G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. **Mol Cancer Res**, v.8, n.5, p.629-642, 2010.

YILMAZ, M. *et al.* Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. **Trends Mol Med**, v.13, n.12, p.535-541, 2007.

YILMAZ, M. *et al.* Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. **Trends Mol Med**, v.13, n.12, p.535-541, 2007.

YUE, P. Y. *et al.* A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. **J Biomol Screen**, v.15, n.4, p.427-433, 2010.

ZHAO, X.; GUAN, J. L. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. **Adv Drug Deliv Rev**, v.63, n.8, p.610-615, 2010.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ZHOU, Q. *et al.* Contortrostatin, a dimeric disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix*, inhibits breast cancer progression. **Breast Cancer Res Treat**, v.61, n.3, p.249-260, 2000.

ZHU, L. *et al.* Preclinical molecular imaging of tumor angiogenesis. **Q J Nucl Med Mol Imaging**, v.54, n.3, p.291-308, 2010.

ZIGRINO, P. *et al.* Role of ADAM-9 disintegrin-cysteine-rich domains in human keratinocyte migration. **J Biol Chem**, v.282, n.42, p.30785-30793, 2007

