

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

PRODUÇÃO RECOMBINANTE E CARACTERIZAÇÃO DE UMA DESINTEGRINA DA
PEÇONHA DE *Rhinocerothis alternatus* (ANTIGA *Bothrops alternatus*) COM ATIVIDADE ANTI-
METASTÁTICA VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO FÁRMACO.

CARMEN LUCIA SALLA PONTES

SÃO CARLOS – SÃO PAULO

2011

PRODUÇÃO RECOMBINANTE E CARACTERIZAÇÃO DE UMA DESINTEGRINA DA PEÇONHA DE *Rhinocerothis alternatus* (ANTIGA *Bothrops alternatus*) COM ATIVIDADE ANTI-METASTÁTICA VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO FÁRMACO.

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

PRODUÇÃO RECOMBINANTE E CARACTERIZAÇÃO DE UMA DESINTEGRINA DA
PEÇONHA DE *Rhinocerophis alternatus* (ANTIGA *Bothrops alternatus*) COM ATIVIDADE ANTI-
METASTÁTICA VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO FÁRMACO.

CARMEN LUCIA SALLA PONTES

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Ciências, área de concentração Bioquímica e Biologia Molecular.

SÃO CARLOS – SÃO PAULO

2011

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

P814pr

Pontes, Carmen Lucia Salla.

Produção recombinante e caracterização de uma desintegrina da peçonha de *Rhinocerophis alternatus* (antiga *Bothrops alternatus*) com atividade antimetastática visando o desenvolvimento de um novo fármaco / Carmen Lucia Salla Pontes. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

119 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Bioquímica. 2. Desintegrina. 3. *Bothrops alternatus*. 4. Integrinas. 5. Tumores. 6. Metástase. I. Título.

CDD: 574.192 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

**“PRODUÇÃO RECOMBINANTE E CARACTERIZAÇÃO DE UMA
DESINTEGRINA DA PEÇONHA DE *Rhinoceros alternatus* (antiga
Bothrops alternatus) COM ATIVIDADE ANTI-METASTÁTICA VISANDO O
DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO FÁRMACO”**

Tese de Doutorado de
CARMEN LUCIA SALLA PONTES

Banca Examinadora

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

Dra. Renata Santos Rodrigues *Renata S. Rodrigues*

Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti *Márcia R. Cominetti*

Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes *Eliane Candiani Arantes*

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza *Dulce Helena*

Dedico esse árduo trabalho aos meus pais Paulo (*in memoriam*) e Carmela, ao meu irmão Francisco Arthur e a minha avó Olga (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dra.Heloisa, por ter me aceito inicialmente na época de graduação para me iniciar nos caminhos da pesquisa e durante todos esses anos ter me ensinado a sempre buscar e desbravar campos antes não transitáveis.

Ao Oscar, agradeço por ser meu “mentor” na bancada do laboratório nos tempos de graduação período que fui considerada sua “escravinha” e que segundo ele ainda sou. Obrigada por me ensinar a ser independente na realização dos experimentos, o que me proporcionou um grande aprendizado colocado em prática principalmente nos estágios no exterior.

Aos Atuais Alunos do Laboratório: Aninha, Natália, Rafaella, Cyntia (Nordeste), Livia (Broa), Uliana, Camila, Sabrina, Guilherme e Vinicius, obrigada pela oportunidade da troca de experiência e também pelos momentos de diversão.

À Kelli (flor), minha sempre amiga, companheira desde o início no LBBM, exemplo de esforço, dedicação e capacidade, à Carol, amiga, confidente, exemplo de paixão pela ciência ,à Dani, rainha dos blots, humildade e vontade em aprender e que tem muito a ensinar, ao Charles, amigo sempre calmo, detalhista e companheiro, obrigada pelas risadas nas horas tristes, palavras de apoio nas horas de superação e pelas cervejas em todos os momentos.

À Patrícia B.Godoi, que se tornou uma grande amiga, obrigada principalmente pelas saidinhas para desestressar onde falávamos 15 minutos do que estava nos irritando no trabalho e o resto da noite conversando sobre qualquer outro assunto exceto trabalho, chegando no final da noite prontas para mais uma semana de trabalho e a Márcia (benhê), obrigada pelas risadas e bom humor e palavras de incentivo a todo momento, no final do dia, isso conta muito.

Aos antigos Alunos do Laboratório: Márcia Cominetti, Juliana Uema, Raquel Mesquita-Ferrari, Mônica Iemma, Sabrina Oliveira, Aninha, Aline, Rafael, Daíse, Natália e Silvia, com os quais tive o prazer de conviver, ensinar e aprender , rir e tornar os dias alegres e suaves, o meu muito obrigada!

As antigas alunas e especiais amigas: Milena, *fia*, começou como veterana e bixete, depois colegas de laboratório e terminamos hoje como grandes amigas que apesar da distância, das maluquices das nossas vidas sempre encontramos um tempinho para nossas conversas e apoio mútuo além de ser uma das poucas a entender a *minha língua*. Thaissa, delicada e decidida, traçou um caminho e o está conquistando, isso muito me incentiva a seguir sempre em frente e Ritinha, sempre disposta a ajudar, um exemplo que sempre tentei seguir, amiga para todas as horas, companheira de fuga de laboratório junto com a Milena para as nossas aulas de dança de salão.

Aos integrantes do laboratório: Bete, Zé Roberto e Natália, obrigada pela ajuda durante o dia-a-dia no laboratório, são pequenas coisas que nos ajuda no desenvolvimento dos experimentos.

As ex-alunas de Iniciação Científica: Araceli, Patty e Verônica, obrigada por terem me permitido supervisioná-las no laboratório durante o período inicial da vida científica de vocês, sendo um dos períodos mais importantes a meu ver para o desenvolvimento de uma vida acadêmica de futuro.

Agradeço à professora Maria Luiza Vilela Oliva da Unifesp, por ter aberto as portas de seu laboratório e permitido disfrutar da estrutura e dos recursos físico e humano do seu laboratório.

Ao Dr. Michel Crépin e Dra. Françoise Fauvel-Lafeve, agradeço por terem me recebido em sua unidade de pesquisa, disponibilizando a estrutura física e pessoal na minha orientação em experimentos presentes neste trabalho.

À Dra. Clara Nahmias e Sylvie Rodrigues, agradeço por terem se interessado pela minha disponibilidade em ajudar e aprender e terem aberto as portas do Institut Cochin e de seu laboratório me proporcionado um período de grande aprendizado.

Ao Dr. Francis Markland e sua esposa Wendy, agradeço pela constante preocupação com a minha estadia em Los Angeles e por ter aberto as portas do seu laboratório e da USC-Keck Medicine School e ter me proporcionado um período de consolidação do meu conhecimento científico na área de desintegrinas.

Ao Dr. Steven Swenson, sua esposa Cindy e seu cachorro Buster, primeiramente por terem me acolhido em sua casa com grande gentileza e carinho, o meu muito obrigada. Agradeço também ao Dr. Steve por me oferecer uma discussão científica diária sobre diversos temas e em se preocupar em me oferecer condições para o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao pesquisador Radu Minea, agradeço pelas várias discussões acaloradas, por me mostrar o seu ponto de vista sobre perspectivas sobre a área fantástica das desintegrinas, pela troca de experiência como pesquisador, por me orientar em experimentos presentes neste trabalho e pelos almoços descontraídos.

Aos alunos dos laboratórios visitados: Todos nós sabemos como é complicada a visita a um laboratório diferente do seu, pois cada um tem uma dinâmica, uma rotina e regras diferentes. Imagina um laboratório onde, além disso todos falam uma língua diferente da sua, complicado? Sim! No

entanto, nos três laboratórios (Hôpital Saint Louis, Institut Cochin e USC-Norris Comprehensive Câncer) encontrei ótimas pessoas com as quais pude contar com a compreensão e apoio ao ajudar uma aluna estrangeira o que tornou a minha estadia bem proveitosa acadêmica, científica e pessoalmente e totalmente enriquecedora. Por tudo isso, deixo aqui o meu agradecimento sincero.

Aos amigos nascidos das experiências fora de “casa”: Keyla (guria), Gelvan (Vizinho) e todos os outros moradores da Maison du Brésil (2008-2009), com quem compartilhei 6 meses de grande aprendizado, experiências pessoais e profissionais das mais diversas e enriquecedoras, das quais estou grata por vocês terem compartilhado comigo, desde viagens a mensagens offline, dos cafés durante as tardes de domingo e jantares tarde da noite no primeiro andar, das conversas regadas a vinho, queijo, jantares, festas de integração Merci beaucoup!

Sara, Yumiko, Charlie, Anthony, pessoas especiais com as quais também tive o prazer de conviver um tempo menor, apenas 3 meses, mas que não deixou de ser intenso. 24 horas imersas na cultura americana, com troca de experiência, aperfeiçoamento da língua inglesa, aprendendo hábitos e costumes americanos (barbecues de domingo, filmes e series sem legenda, claro!). Foi uma experiência interessante que me proporcionou mudar o meu conceito em relação aos EUA. Thank you!

Agradeço aos membros do laboratório de Fisiologia do Exercício por darem apoio na hora do sufoco, quer dizer, quando precisamos de força masculina pra levantar um barrilete de água, alguém pra doar sangue pela pesquisa e até mesmo para comer uma pizza a noite no departamento esperando a chuva passar para irmos embora para casa depois de um longo dia de trabalho. Além da troca de conhecimentos em fisiologia relacionada ao exercício.

Aos meus sempre amigos: “perua” Ellen, que segundo suas próprias palavras me “despacha no aeroporto” todas as vezes que me aventuro fora em busca de novos conhecimentos, obrigada pelo apoio, por se fazer sempre presente como era na época da faculdade, essa amizade vou levar pra vida toda, Ana Emilia que diz que nos momentos mais estressante eu tenho uma “voz calma e de otimismo”, apesar da distancia de ambas as partes, sabemos que estaremos sempre presente, “dona” Bruna “amiga desde o primeiro dia em São Carlos”, obrigada pela amizade, incentivo, carinho e companheirismo e saiba que a considero como uma irmã.

Aos meus pais, Paulo (*in memoriam*) e Carmela e ao meu irmão Francisco Arthur pelo amor, incentivo e apoio incondicional desde cedo à difícil vida de pesquisadora e nunca ter me permitido desistir dos meus sonhos apesar de pedras surgirem no caminho.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução e suas funcionárias: Greissi, Heloisa e Ivanildes, obrigada pela permanente atenção e por sempre estarem dispostas a nos ajudar em diversos assuntos relacionados ao bem-estar do aluno e da pós-graduação.

A Capes agradeço pela concessão da bolsa de estudos no exterior, pelo programa PDEE, que possibilitou a troca de experiência com pesquisadores estrangeiros e enriquecer os resultados e discussão deste trabalho.

Ao CNPq, agradeço pela concessão da bolsa de estudos no país, recursos financeiros adicionais e pela bolsa de estudos no exterior (SWE) que disponibilizou recursos para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente me auxiliaram durante esse longo caminho que por ventura posso não ter mencionado aqui seus nomes. Obrigada!

“A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana.” (Louis Pasteur)

“Não há lugar para sabedoria onde não há paciência.” (Santo Agostinho)

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza dos seus sonhos.” (Eleanor Roosevelt)

RESUMO

Este trabalho apresenta o estudo dos efeitos de uma desintegrina RGD de *Rhinocerosphis alternatus* (antiga *Bothrops alternatus*) nas principais etapas da cascata metastática. Desintegrinas são peptídeos ricos em cisteína, os quais apresentam diversas atividades biológicas relacionadas à interação célula-célula e adesão celular. O pareamento correto das pontes de dissulfeto expõe o motivo adesivo, o qual confere a especificidade de ligação das desintegrinas. Estas moléculas seletivamente bloqueiam a função adesiva das integrinas, as quais participam diretamente de diversos processos fisiológicos e patológicos. Na primeira parte deste trabalho utilizamos a DisBa-01, uma desintegrina de *B.alternatus* fusionada com 6 histidinas em sequência referente ao peptídeo de fusão presente no vetor pET28a. A DisBa-01 em sistema de adesão sob fluxo inibiu a adesão de células de melanoma B16F10 e de plaquetas ao colágeno tipo I e ativou a adesão das células de melanoma B16F10 ao colágeno tipo III. Na transmigração e na adesão das células de câncer de mama MDA-MB-231 pelas células endoteliais, a DisBa-01 apresentou a tendência à redução destas etapas da cascata metastática. As desintegrinas têm sido instrumentos no desenvolvimento de moléculas com potencial aplicação terapêutica e juntamente com esses efeitos apresentados pela DisBa-01 neste trabalho assim como em outros de nosso laboratório, nos conduziu para a segunda parte deste trabalho, a produção da desintegrina de *B.alternatus* sem o peptídeo de fusão (ATN) que conferiu aumento de solubilidade da desintegrina. A ATN foi isolada através de duas cromatografias de exclusão molecular e uma cromatografia de troca de iônica e a caracterização biológica foi direcionada ao papel anti-metastático desta molécula. Neste sentido, a ATN não foi capaz de promover a adesão das células de eritroleucemia humana (K562), mas inibiu a adesão das células tumorais K562, B16F10 e MDA-MB-231 à fibronectina, mas não apresentou efeito sobre os fibroblastos. A ATN não desadere os fibroblastos aderidos à fibronectina mas, promove o descolamento das células K562 e B16F10 previamente aderidas à fibronectina. No entanto, não induz fragmentação do DNA celular, não apresentando efeito pró-apoptótico. Na proliferação celular, a ATN apresenta efeito com 48 horas de incubação com células tumorais B16F10 mas, em fibroblasto e células MDA-MB-231 esse efeito não foi observado. Por citometria de fluxo verificamos a interação da ATN com a integrina $\alpha\beta3$. A migração das células MDA-MB-231 Texas foi inibida pela ATN assim como alterou o citoesqueleto de actina destas células. No entanto, um aumento da atividade da MMP-9 foi observado nas células MDA-MB-231 tratadas com ATN assim como a invasão das células MDA-MB-231 foi induzida por esta desintegrina-RGD. Estes resultados incentivam a continuação dos estudos com esse peptídeo no sentido de buscar a melhor concentração desta desintegrina, a identificação de atividade citotóxica assim como melhor método de distribuição desta molécula *in vivo*.

ABSTRACT

This work presents the study of the effects of an RGD disintegrin from *Rhinocerophis alternatus* (ancient *Bothrops alternatus*) in key steps of the metastatic cascade. Disintegrins are cysteine-rich peptides, which have several biological activities related to cell-cell interaction and cell adhesion. The correct pairing of disulfide bonds exposes the adhesive motif which confers binding specificity of disintegrins. These molecules selectively blocks the adhesive function of integrins, which directly participate in various physiological and pathological processes. In the first part of this work, we use the DisBa-01, a disintegrin from *B.alternatus* in fusion with 6 histidines in pET28a expression vector. The DisBa-01 in the flow system inhibited adhesion of B16F10 melanoma cells and platelets to *type* I collagen and activated the adhesion of B16F10 melanoma cells to *type* III collagen. In transmigration and adhesion of breast cancer cells MDA-MB-231, the DisBa-01 had the tendency to reduce these stages of metastatic cascade. The disintegrins have been instrumental in the development of molecules with potential therapeutic application and the effects produced by DisBa-01 in this work as well as others from our laboratory, led us in the second part of this work, the production of the disintegrin *B.alternatus* without the fusion peptide (called ATN) which conferred increased solubility of the disintegrin. ATN was isolated by two molecular exclusions chromatography and ion exchange chromatography and biological characterization was directed to the anti-metastatic effect of this molecule. In this sense, the ATN was unable to promote the adhesion of human erythroleukemia K562 cells, but inhibited the adhesion of tumor cells K562, B16F10 and MDA-MB-231 to fibronectin had no effect in fibroblasts. ATN is not able to detach the fibroblasts adhered to fibronectin but promotes the detachment of K562 and B16F10 cells previously adhered to fibronectin. However, it does not induce fragmentation of cellular DNA, showing no pro-apoptotic effect. In cell proliferation, the ATN has negative effect with 48 hours of incubation with B16F10 tumor cells, but fibroblasts and MDA-MB-231 this effect was not observed. By flow cytometry we observed the interaction of ATN with $\alpha v \beta 3$ integrin. The MDA-MB-231 Tx migration was inhibited by ATN and changed the actin cytoskeleton of these cells. However, an increased activity of MMP-9 was observed in MDA-MB-231 treated with ATN and the invasion of MDA-MB-231 was induced by the RGD disintegrin. These results encourage further studies with this disintegrin in seeking the best concentração of the disintegrin, the identification of cytotoxic activity as well as the best method of distribution of this molecule *in vivo*.

Lista de Abreviaturas

Abreviação e Sigla	Descrição
ADAM	Proteína modular com domínios metalopeptidase e tipo-desintegrina
Akt	Proteína quinase B
Alt-C	Alternagina-C
ATN	Alternatina
B16F10	Célula de melanoma murino
BCA	Ácido Bicincrônico
BCIP	5-Bromo-4-Cloro-3'-Indolil fosfato p-Toluidina
bFGF	Fator de crescimento de fibroblasto básico
BLAST	Programa computacional para busca de homologias locais entre sequências de ácidos nucleicos e proteínas
BBB	Barrera hematoencefálica
BSA	Soro albumina bovina
cDNA	Ácido-Deóxirribonucleico complementar
CMFDA	Diacetato clorometilfluoresceína
CN	Contortostatina
D.O	Densidade óptica
D/ECD	Ácido aspártico/ ácido glutâmico-cisteína-ácido aspártico
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DisBa-01	Desintegrina de <i>Bothrops alternatus</i>
DMEM	Dulbecco's modified eagle médium
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

Abreviação e Sigla	Descrição
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGF	Fator de crescimento epidermal
ELISA	Ensaio de imuno-absorção por ligação enzimática
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
F-actina	Fibras de actina
FAK	Quinase de adesão focal
GFP	Proteína fluorescente verde
GST	Glutathiona S-transferase
HCASMCS	Célula de músculo liso de artéria coronária humana
hCMEC/D3	Célula endotelial microvascular cerebral humana
HEPES	4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazina ácido etanosulfônico
HF3	Botropasina
HMEC	Célula endotelial microvascular humana
HUVEC	Células endotélias de veia de cordão umbilical humano
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50% da atividade
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo
K562	Célula de eritroleucemia humana
LB	Luria Bertani
Luc	Luciferase
MAPK	Proteína Quinase Ativada Por Mitógeno
MDA-MB-231	Célula de câncer de mama estrógeno independente
MDA-MB-231 Tx	Célula de câncer de mama estrógeno independente, clone Texas
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteases de matriz extracelular

Abreviação e Sigla	Descrição
MWCO	“Molecular weight cut off”
NBT	Nitroazul de tetrazólio
NCBI	Centro de Informações Biotecnológica dos Estados Unidos
NK	Natural killer
ORF	Fase aberta de leitura
PAF	Paraformaldeído
pb	Pares de bases
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pDisBa-01	Plasmídeo com o gene da <i>DisBa-01</i>
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-quinase
PRP	Plasma Rico em Plaqueta
PPP	Plasma Pobre em Plaqueta
qsp	quantidade suficiente para
RGD	Argina-glicina-ácido aspártico
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute
S1	Sobrenadante de extrato celular obtido em condições não desnaturantes
S2	Sobrenadante de extrato celular obtido em condições desnaturantes
SDF-1 α	Fator 1 alfa derivado de célula estromal
SDS	Duodecil sulfato de sódio ou lauril sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SFB	Soro fetal bovino
SRC	Tirosina Quinase citoplasmática
SVMPs	Metaloproteases de veneno de serpente

Abreviação e Sigla	Descrição
T0	Tempo zero de indução do extrato bacteriano
T3	Tempo de 3 horas após a indução do extrato bacteriano
TBS	Solução tamponada com NaCl e Tris
TGF- β	Fator de crescimento tumoral beta
TIMPs	Inibidor tecidual de metaloproteinases
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
UV	Ultra-violeta
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
VEGFR	Receptor de Fator de Crescimento Vascular Endotelial
ZO-1	Zônula ocludente

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura de uma integrina	23
Figura 3. Vias de sinalização ativada ou modulada por integrinas (outside-in).	24
Figura 4. Fibroblasto e sua interação com o estroma tumoral.	27
Figura 5. Representação esquemática das MMPs	28
Figura 6. Ativação das MMPs	29
Figura 7. Relação MMP, célula tumoral e célula endotelial.	29
Figura 8. Cascata de eventos da Angiogênese.	30
Figura 9. Cascata metastática.	32
Figura 10. <i>Bothrops alternatus</i>	36
Figura 11. Representação esquemática da nova classificação das SVMPs proposta por Fox e Serrano (2008).	38
Figura 12. Desintegrina de <i>Bothrops alternatus</i> (DisBa-01).	39
Figura 13. Inibição da adesão de células de melanoma murino e plaquetas ao colágeno tipo I em condição de fluxo	51
Figura 14. Inibição da Adesão de células de melanoma murino e plaquetas ao colágeno tipo I em condição de fluxo	52
Figura 15. Na menor concentração em condição de fluxo, DisBa-01 aumenta a adesão das células tumorais ao colágeno tipo III	53
Figura 16. Determinação de Monocamada Celular da linhagem hCMEC/D3	54
Figura 17. Efeito da DisBa-01 na adesão de células tumorais a células endotelial cerebral	55
Figura 18. Migração transendotelial de células tumorais MDA-MB-231	56
Figura 19: Ciclo do Programa de PCR	63
Figura 20. Amplificação da sequência codante da desintegrina de <i>Bothrops alternatus</i>	77
Figura 21. Análise de Restrição do plasmídeo pATN	78
Figura 23. Alinhamento de nucleotídeos da DisBa-01 e clone 2 da ATN.	79
Figura 25. Alinhamento das sequências de aminoácidos da DisBa-01, ATN e sequencia depositada no GeneBank.	80
Figura 26: Expressão Heteróloga e Solubilidade da ATN e Western Blotting	81
Figura 27. Curva de Titulação de Anticorpos anti-DisBa-01	82
Figura 28. Gel de eletroforese representando os resultados obtidos pela cromatografia de afinidade a anticorpo	83
Figura 29. Primeira Etapa de Purificação_Superdex 200	84
Figura 30. Segunda Etapa de Purificação_Superdex 75	85
Figura 31. Etapa final de purificação_MonoQ 5/50 Gl	86
Figura 32. Análise da Expressão de Integrinas das células Fibroblastos, MDA-MB-231 e K562.	88
Figura 33: Promoção da Adesão das células K562 a Alternatin	89
Figura 34. Ensaio de Inibição da Adesão celular à fibronectina	90
Figura 35. Desadesão celular	91
Figura 36. Inibição da proliferação celular em 24 e 48 horas de incubação com a ATN	92
Figura 37. Fragmentação de DNA de culturas de células tratadas com ATN	93
Figura 38. Competição por Anticorpos em células K562	95
Figura 39. Efeito de 100 nM de ATN nos receptores celulares para fibronectina e vitronectina em células MDA-MB-231	96
Figura 40. Atividade basal da MMP-2	97
Figura 41. Atividade basal da MMP-9	98
Figura 42. Despolimerização de F-Actina do citoesqueleto	99
Figura 43. Baixa concentração de ATN estimula a invasão das MDA-MB-231	100
Figura 44. ATN inibe a migração de MDA-MB-231 Tx	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Componentes da reação de PCR	62
Tabela 2: Resumo das Atividades da ATN	110

SUMÁRIO

1. Introdução	21
1.1 Revisão Bibliográfica	22
1.1.1 Integrinas	23
1.1.2 O Tumor e seu Microambiente	26
1.1.3 Metaloproteases de Matriz (MMP)	28
1.1.4 Angiogênese	30
1.1.5 Metástase	31
1.2 Peçonha de Serpente _ fonte de Biomoléculas ativas	35
1.2.1 Metaloproteases de Veneno de Serpente (SVMP)	36
1.2.2 Desintegrinas	39
2. Objetivos	43
CAPÍTULO 1 EFEITOS DA DISBA-01 NO PROCESSO DE EXTRAVASAMENTO TUMORAL	44
3. Materiais e Métodos	45
3.1 Produção da DisBa-01	45
3.2 Quantificação Protéica	46
3.3 Linhagens Celulares e Cultura	46
3.4 Determinação de Monocamada de Células Endoteliais de Cérebro Humano (hCMEC/D3) _Imunomarcação de proteína de junções celulares	46
3.5 Dosagem de Luciferase	47
3.6 Ensaios de Adesão Celular	48
3.6.1 Condição de Fluxo	48
3.6.2 Condição Estática _ Adesão Célula-Célula	48
3.7 Ensaio de Transmigração Celular	49
3.8 Análise Estatística	50
4. Resultados	51
4.1 DisBa-01 afeta a adesão de células de melanoma murino em condição de fluxo	51
4.2 Formação da Monocamada Celular de hCMEC/D3 e suas junções celulares	53
4.3 Efeito da DisBa-01 na adesão das células tumorais nas células endoteliais cerebrais	55
4.4 Efeito da DisBa-01 na transmigração endotelial de células MDA-MB-231	56
5. Discussão	57
CAPÍTULO 2 ESTUDOS COM ATB NAS DIVERSAS ETAPAS DO PROCESSO METASTÁTICO	61
6. Materiais e Métodos	62
6.1 Subclonagem da ATN	62

6.2 Seqüenciamento de DNA	64
6.3 Caracterização Bioquímica da Alternatin(ATN)	64
6.3.1 Expressão e Solubilidade da ATN	64
6.3.2 Purificação da proteína ATN	65
6.4 Produção de Anticorpos Policlonais	66
6.4.1 Titulação dos Anticorpos Policlonais	66
6.4.2 Purificação da Fração de IgG do Soro de Animais Imunizados	67
6.4.3 Coluna de Afinidade de Anticorpos	67
6.5 Caracterização Proteica	68
6.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	68
6.5.2 Immunoblotting	69
6.6 Dosagem de Proteína	69
6.7 Ensaio de Atividade Biológica	70
6.7.1 Ensaio Celulares	70
6.7.2 Inibição da Adesão Celular	70
6.7.3 Promoção da Adesão Celular	71
6.7.4 Desadesão Celular	71
6.7.5 Proliferação Celular	72
6.7.6 Avaliação da apoptose por eletroforese de DNA	72
6.7.7 Análise de Receptores Celulares por Citometria de Fluxo	73
6.7.8 Competição de Anticorpos	73
6.7.9 Zimografia	74
6.7.10 Indução da polimerização do citoesqueleto de actina	74
6.7.11 Ensaio de Invasão Celular	75
6.7.12 Ensaio de migração celular por Wound Healing	76
6.8 Análise Estatística	76
7. Resultados	77
7.1 Subclonagem da ATN	77
7.2 Sequenciamento de DNA	78
7.3 Expressão e Solubilidade	80
7.4 Produção, Titulação e Purificação dos Anticorpos anti-DisBa-01 Policlonais de coelhos	81
7.5 Purificação da proteína ATN	83
7.6 Determinação de Receptores Celulares	87
7.7 Promoção da Adesão Celular pela ATN	88
7.8 Inibição da Adesão Celular	89
7.9 Desadesão Celular	91
7.10 Proliferação Celular	92
7.11 Fragmentação de DNA	93
7.12 Competição de Ligação a Receptores na Membrana Celular	94

<i>7.13 Atividade Basal de Gelatinases A e B _ Metaloprotease de Matriz</i>	<i>96</i>
<i>7.14 Polimerização de Actina</i>	<i>98</i>
<i>7.15 Invasão Celular da MDA-MB-231 Tx</i>	<i>100</i>
<i>7.16 Migração Celular das MDA-MB-231 Tx _ Wound Healing</i>	<i>100</i>
<i>8. Discussão</i>	<i>102</i>
<i>9. Conclusões</i>	<i>110</i>
<i>10. Referências</i>	<i>112</i>

1.Introdução

No ano de 2010, o câncer foi considerado nos EUA o maior problema de saúde pública, responsável por 1 em cada 4 mortes (JEMAL *et al.*, 2010).

No Brasil, desde 1999, o Programa de Epidemiologia e Vigilância do Câncer e seus Fatores de Risco coloca o câncer ao lado de doenças cardiovasculares, como uma das doenças que mais causam óbito no Brasil e desde 2003 é a segunda maior causa de morte na população brasileira. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2009), na última estimativa realizada, 489.270 novos casos seriam diagnosticados entre os anos 2010-2011, sendo o câncer de próstata e o câncer de mama os mais incidentes no sexo masculino e feminino, respectivamente.

Alguns dos grandes desafios de combate ao câncer atualmente são a compreensão e o controle deste tipo de doença altamente complexa que relaciona fatores socioculturais com fatores genéticos, epigenéticos e moleculares em uma única equação, infelizmente sem resolução única. Neste cenário, há 28078 estudos clínicos relacionados à palavra câncer e destes, 372 estudos estão no Brasil, segundo busca realizada no site americano *clinicaltrials.gov* em maio de 2011. Mundialmente, a pesquisa aplicada ao câncer perfaz ¼ de todos os estudos clínicos em andamento, resultado da importância deste problema para a saúde pública da população mundial.

Neste cenário, estudos na prospecção de novas moléculas capazes de ajudar no desenvolvimento de fármacos atuantes nessa doença ou até mesmo como instrumentos para o entendimento de processos celulares e moleculares inerentes ao câncer faz que a cada momento uma molécula nova apareça. Neste cenário surgiu a DisBa-01, uma desintegrina monomérica RGD recombinante de *Bothrops alternatus* que nos últimos anos apresentou atividades interessantes associada ao bloqueio do desenvolvimento tumoral.

Ramos e colaboradores (2008) demonstraram que a DisBa-01 é expressa de forma solúvel em bactérias apesar da existência de 6 pontes dissulfeto. Além disso, esta desintegrina é capaz de inibir a adesão de células de melanoma murino (B16F10) à vitronectina, importante molécula da matriz extracelular, assim como impede a proliferação destas células e de células endoteliais (HMEC-I). Estes pesquisadores também demonstraram o papel desta molécula na inibição da agregação plaquetária *in vitro* e *in vivo* como também

impede o desenvolvimento de trombose e metástase em camundongos atímicos. Na linha de estudos *in vitro* com essa molécula, foi verificada por Selistre-de-Araújo e colaboradores (2010) o efeito inibitório desta molécula na migração de fibroblastos e células de câncer de mama e de próstata corroborando com o resultado observado anteriormente para a migração de células endoteliais *in vivo* (RAMOS et al.,2008), o que torna essa molécula interessante de ser estudada.

1.1 Revisão Bibliográfica

“Câncer: conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo.”

(Texto extraído do site: <http://www.inca.gov.br>)

O câncer é um processo multifatorial no qual células somáticas em transformação apresentam acúmulo de mudanças genéticas e epigenéticas que desregulam os mecanismos de controle dos processos celulares resultando na quebra da homeostase celular (SILVA *et al.*, 2007; MBEUNKUI;JOHANN JR, 2009; YU; MOUW; WEAVER., 2010). Uma das características mais marcantes observada neste processo é a alteração na capacidade adesiva das células. A alteração na habilidade de interação celular tanto com outra célula quanto com a matriz extracelular (MEC) pela modificação da expressão de diversas moléculas adesivas pode interferir em processos fisiológicos e celulares como morfogênese, organogênese, inflamação, migração, sobrevivência e apoptose celular (LI *et al.*, 2008; YU; MOUW; WEAVER., 2010).

Os receptores celulares de adesão são divididos em 4 grupos: caderinas, selectinas, família das imunoglobulinas e integrinas. As integrinas são os principais receptores adesivos presentes nas células e, além disso, também participam da transdução de sinais modulando diversas funções celulares tais como proliferação celular, migração e morte celular (BERRIER, YAMADA, 2007; STANISZEWSKA *et al.*, 2008; YU; MOUW; WEAVER *et al.*, 2010). A adesão celular mediada por integrinas coordena diversos processos desde fisiológicos como fertilização, resposta imune, agregação plaquetária até patológicos como angiogênese tumoral e metástase (MILLARD; ODDE; NEAMANTI, 2011).

1.1.1 Integrinas

As integrinas são proteínas transmembrana heterodiméricas, constituídas por uma subunidade α e uma subunidade β , ligadas não covalentemente e constitutivamente não estão em seu estado ativado (figura 1). Atualmente são conhecidas 18 subunidades α e 8 subunidades β o que perfaz 24 diferentes receptores que se ligam a várias proteínas de matriz com diferente afinidade (figura 2) (BERRIER; YAMADA, 2007; MILLARD; ODDE; NEAMANTI, 2011).

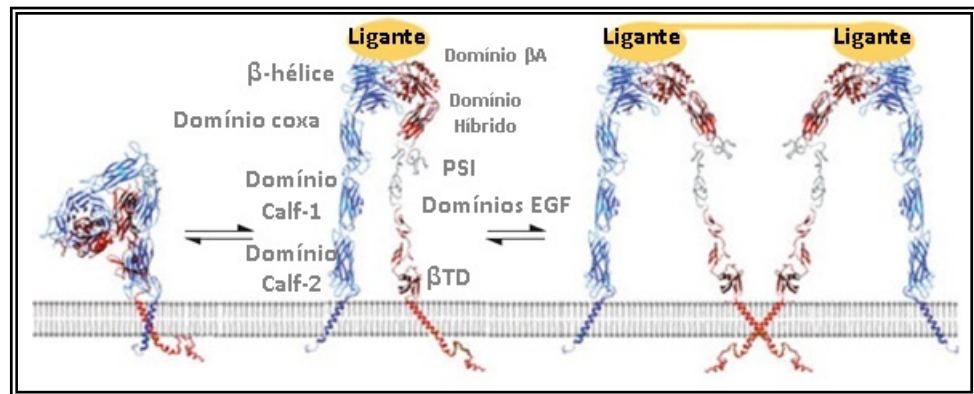


Figura 1. **Estrutura de uma integrina.** Conformação no estado inativado e no estado ativado. Extraído e modificado MA; QIN; PLOW, 2007.

O domínio extracelular destas moléculas transmembrana se liga à componentes da MEC e cátions divalentes como também a outros receptores nas células adjacentes enquanto o domínio intracelular é capaz de estabelecer ligações com proteínas intracelulares como talina e assim promover uma organização do citoesqueleto celular (BERRIER, YAMADA, 2007). Na transdução de sinal pelas integrinas, proteínas intracelulares como talina, vinculina e α -actinina e proteínas de sinalização como quinase de adesão focal (FAK), SRC e paxilina são recrutadas e participam da sinalização bidirecional *inside-out* e *outside-in* característico deste tipo de receptor (RIA *et al.*, 2010).

Família de Integrinas	Ligantes Seletivos
	$\alpha 1$ Laminina, colágeno
	$\alpha 2$ Laminina, colágeno, $\alpha 3\beta 1$
	$\alpha 3$ Laminina, colágeno, fibronectina, epiligrina, entactina, $\alpha 2\beta 1$
$\beta 1$	$\alpha 4$ Fibronectina (CS-1), VCAM
	$\alpha 5$ Fibronectina (RGD), L1-CAM, fibrinogênio
	$\alpha 6$ Laminina, merosina, kalinina
	$\alpha 7$ Laminina
	$\alpha 8$ Fibronectina
	$\alpha 9$ Tenascina
	αV Fibronectina, vitronectina
$\beta 2$	αL ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
	αM iC3b, fibrinogênio, Fator X, ICAM-1
	αX iC3b, fibrinogênio
	αIIb Fibrinogênio, fibronectina, fator de vonWillebrand
αV	$\beta 3$ Vitronectina, fibrinogênio, fator de vonWillebrand, colágeno denaturado, trombospondina, Del 1, Cyr 61, FISP
	$\beta 1$ Fibronectina, vitronectina
	$\beta 5$ Vitronectina, osteopontina, Del 1
	$\beta 6$ Fibronectina
	$\beta 8$ Fibronectina
	$\alpha 6\beta 4$ Laminina
	$\alpha 4\beta 7$ VCAM, MADCAM, fibronectina (CS-1)

Figura 2. **Família das Integrinas e seus Ligantes.** Extraído e modificado: JIN; VARNER, 2004.

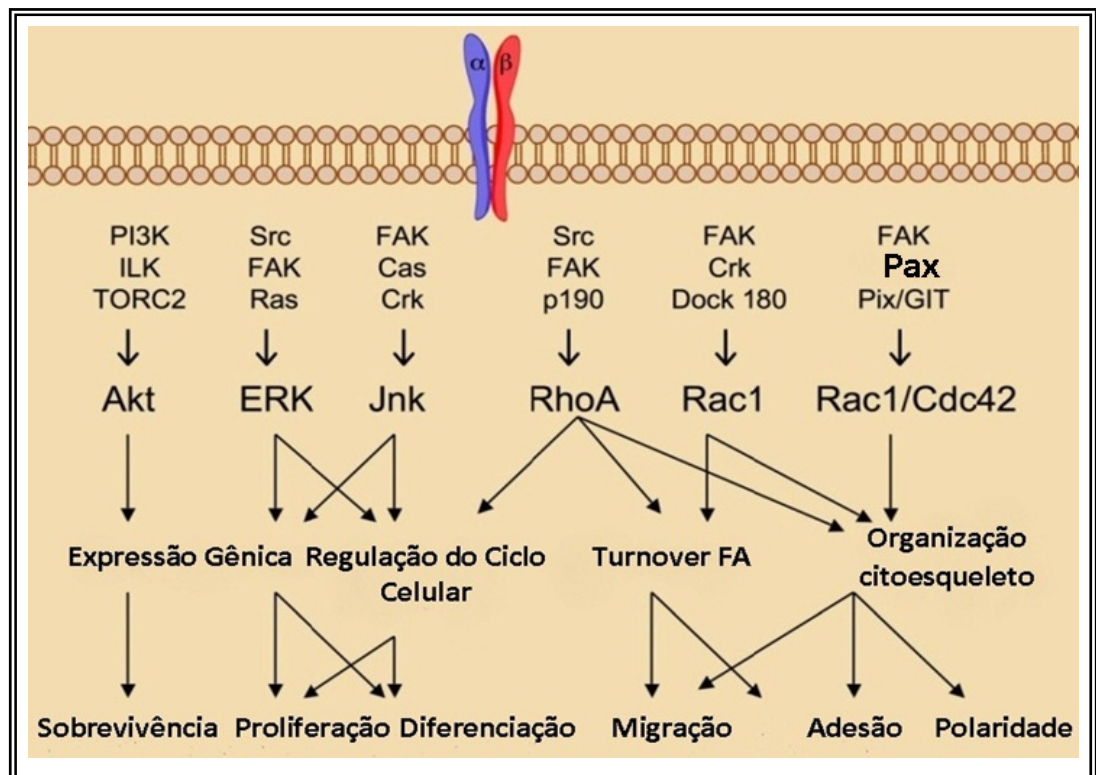


Figura 3. **Vias de sinalização ativada ou modulada por integrinas (outside-in).** Extraído e modificado: MILLARD; ODDE; NEAMANTI, 2011.

A ligação a elementos da MEC surge da sinalização *inside-out* que ocasiona mudança conformacional da integrina alterando a afinidade de ligação com componentes da MEC ou ativando a integrina (GIANCOTTI *et al.*, 1999; ROSS, 2004; BERRIER;YAMADA, 2007). As porções citoplasmáticas das subunidades α e β no seu estado não ativado estão ligadas impedindo a ligação da talina à subunidade β . Ao receber um estímulo extracelular via um fator de crescimento ou citocina através de outro receptor, a talina se liga a subunidade β alterando o estado conformacional da integrina permitindo a ligação as proteínas da MEC e a formação das adesões focais (ULRICH; HEISENBERG, 2009).

A sinalização *outside-in* gerada pela adesão célula-MEC torna ativa a integrina, promovendo o seu agrupamento em uma região da membrana celular dando origem as adesões focais (ou nos *lipid rafts*), que recrutam moléculas de sinalização como a FAK estabilizando estas adesões e ativando cascatas de sinalização dependentes de adesão via integrina como a da via Ras-Raf-MAPK (BERRIER;YAMADA, 2007; MILLARD;ODDE;NEAMANTI,2011). Essa transdução de sinal para o interior da célula também aumenta o pH intracelular, altera os níveis de cálcio e ativa a expressão de alguns genes (ELICEIRI;CHERESH, 2001).

O contato direto ou indireto da FAK com a porção citoplasmática da subunidade β das integrinas permite a autofosforilação da FAK gerando um sítio de ligação para Src que fosforila as proteínas intracelulares paxilina e tensina. Essa sinalização da FAK além da interação com PI3K gera alterações no citoesqueleto celular e ativa diferentes cascatas de sinalização, dentre elas a da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (GIANCOTTI *et al.*, 1999).

Em várias doenças incluindo o câncer, além dos processos celulares dependentes de integrinas estarem desregulados, as proteínas associadas a elas e a expressão destes receptores celulares também podem estar alterados. O aumento da expressão da subunidade $\beta 1$ esta correlacionado com a redução da sobrevivência em caso de câncer de mama (BERRIER;YAMADA, 2007), a expressão elevada da integrina $\alpha v \beta 3$ em células endoteliais vasculares maduras e células tumorais são características metastáticas (KNIGHT *et al.*, 2007).

1.1.2 O Tumor e seu Microambiente

Mudanças locais em um ambiente tecidual através de remodelamento de matriz pelas proteases, aumento de espécies reativas de oxigênio, atuação de moléculas bioativas e oncogênicas, produzidas em um tumor primário distante são essenciais para o desenvolvimento de metástase e a esse local é denominado nicho pré-metastático (KAPLAN *et al.*, 2006). Normalmente as lesões metastáticas se estabelecem devido a alterações genéticas e fenotípicas, no entanto a criação desse microambiente permissivo ao estabelecimento das células tumorais através dos produtos oriundos deste tumor é um pré-requisito essencial para a progressão tumoral. Neste nicho pré-metastático além da importância das quimiocinas e citocinas advindas do tumor primário essenciais para o balanço entre dormência metastática e progressão tumoral é o entendimento das vias de transdução, da transição epitélio-mesênquima e as interações célula-célula e célula-MEC (PSAILA *et al.*, 2007) pois concentramos as investigações nas mudanças que ocorrem nas funções adesivas e migratórias das células tumorais, com o seu extravasamento para circulação sanguínea e o estabelecimento no sítio secundário (KAPLAN *et al.*, 2006).

Os tumores sólidos são compostos por diversos tipos celulares, fatores solúveis e uma matriz extracelular além de vasos sanguíneos ou linfáticos que alimentam os tumores com nutrientes e oxigênio (YU; MOUW; WEAVER., 2010). Basicamente pode-se dividir estruturalmente em dois compartimentos: massa tumoral e estroma tumoral.

A massa tumoral é composta por células cujos processos de sinalização, expressão proteica, proliferação, apoptose e migração estão alterados (STUELLEN *et al.*, 2005). Já o estroma tumoral é composto por elementos celulares como fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliais, células mesenquimais, células inflamatórias e imunes além de diferentes moléculas solúveis como fatores de crescimento e citocinas e uma matriz extracelular (STELLER-STEVENSON, 2008; MBEUNKUI; JOHANN JR, 2009; YU; MOUW; WEAVER., 2010).

A MEC é composta de uma rede de proteínas insolúveis e carboidratos que preenchem a maioria dos espaços intercelulares, além de fatores de crescimento que são secretados pelas células, principalmente fibroblastos. Matrizes extracelulares em diferentes localizações no corpo consistem de diferentes combinações de colágenos, proteoglicanas,

elastina, ácido hialurônico e várias glicoproteínas tais como fibronectina e laminina (HYNES, 1999; BERRIER; YAMADA, 2007).

O fibroblasto associado ao tumor é uma célula constantemente ativa e importante modificador do estroma tumoral (KALLURI; ZEISBERG, 2006). Secretores de fatores de crescimento, como TGF β (fator de crescimento transformante beta) que é capaz de atrair monócitos e macrófagos que liberam fatores pró-angiogênicos como bFGF (fator de crescimento de fibroblasto básico), TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) dentre outros, os fibroblastos estromais também liberam enzimas como MMP (metaloproteases de matriz) e quimiocinas modificando a composição da MEC gerando sinais oncogênicos e angiogênicos (MBEUNKUI; JOHANN JR, 2009; YU; MOUW; WEAVER., 2010) (figura 4).

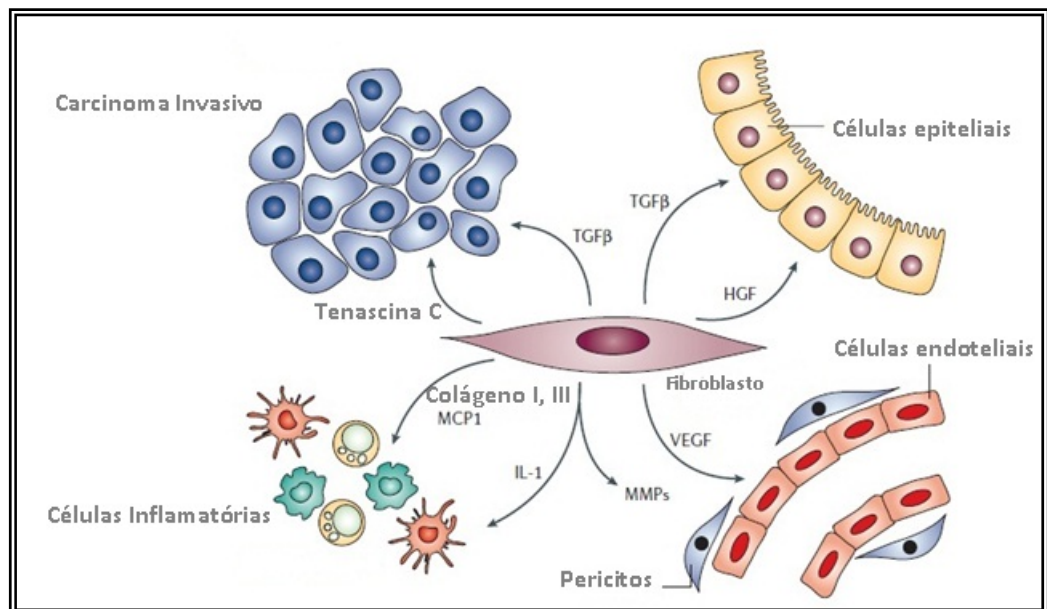


Figura 4. **Fibroblasto e sua interação com o estroma tumoral.** Extraído e modificado: KALLURI; ZEISBERG, 2006.

A interação bidirecional entre a massa tumoral e o estroma circundante cria um ambiente favorável para o crescimento tumoral denominado microambiente tumoral, o qual é altamente ativo mecânica e biologicamente em consequência do seu contínuo remodelamento (LI *et al.*, 2009; YU; MOUW; WEAVER., 2010). Segundo Mbeunkui e Johann Jr (2009), um quadro inflamatório crônico pode disponibilizar citocinas e células inflamatórias capazes de estabelecer um microambiente indispensável para o desenvolvimento neoplásico. No microambiente tumoral, tanto as células tumorais quanto as estromais secretam fatores de crescimento e enzimas que geram alterações (MBEUNKUI; JOHANN JR, 2009; YU;

MOUW; WEAVER., 2010) como remodelamento da MEC resultando em mudanças na interação célula-célula e célula-MEC.

O balanço existente entre protease e seus inibidores são determinantes na progressão tumoral e no desenvolvimento de metástase. As proteases mais relevantes e expressas no microambiente tumoral são as MMPs (THIOLLOY *et al.*, 2009).

1.1.3 Metaloproteases de Matriz (MMP)

As MMPs são enzimas pertencentes à classe das endopeptidases dependentes de zinco capazes de degradar componentes da MEC e proteínas que não são de matriz como TNF- α e TGF- β (STUELTEN *et al* 2005).

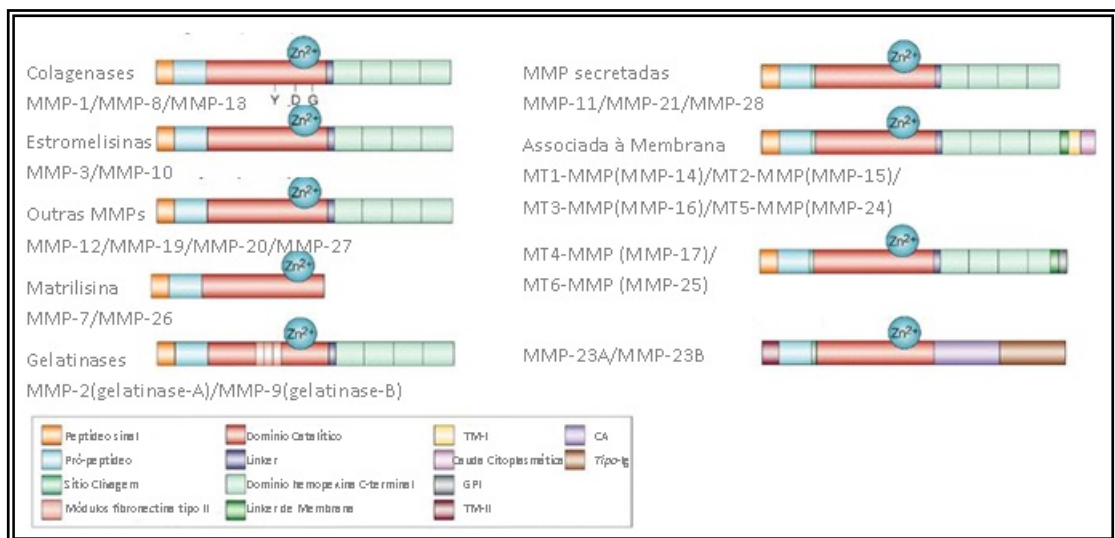


Figura 5. **Representação esquemática das MMPs.** Y, D,G: tirosina, ácido aspártico e glicina presente no sítio catalítico de todas colagenases. GPI: glicosilfosfatidilinositol; CA: arranjo de cisteína. Extraído e modificado: OVERALL; LÓPEZ-OTÍN, 2002.

Elas são divididas em diferentes grupos com base na estrutura e/ou especificidade ao substrato (figura 5). Todos os membros da família das MMPs apresentam um peptídeo sinal seguido de um pró-domínio e um domínio catalítico onde se localiza o sítio conservado de ligação ao zinco (HEXXH) essencial para atividade enzimática. Com exceção das MMP-7, MMP-23 e MMP-26, as MMPs possuem um domínio tipo hemopexina-vitronectina conectado ao catalítico por uma alça (SANTOS-MARTÍNEZ *et al.*, 2007). Todas

as MMPs são produzidas na sua forma latente de zimogênio e depositadas na MEC onde são ativadas por diferentes mecanismos (figura 6).

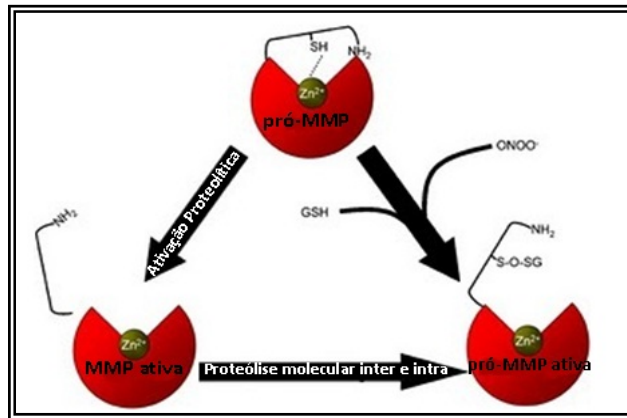


Figura 6. **Ativação das MMPs.** Extraído e modificado de CHOW *et al.*, 2007.

Em circunstâncias fisiológicas normais, os inibidores naturais das MMPs, os TIMPs (inibidores teciduais de metaloproteases), controlam o balanço entre as formas latentes e ativas, pois formam um complexo com as MMPs controlando a ativação e a estabilidade da molécula (CHENG *et al.*, 2009). No entanto, diversos estudos relatam a ausência desse controle em doenças como o câncer, onde há um aumento da expressão e atividade de certas MMPs produzidas pelas células tumorais e fibroblastos associados ao tumor, o que está diretamente relacionado com a angiogênese tumoral e metástase (YAGI; YOTSUMOTO; MIYAMOTO,2008; THIOLOLOY *et al.*, 2009; BERTIN *et al.*, 2010) (figura 7).

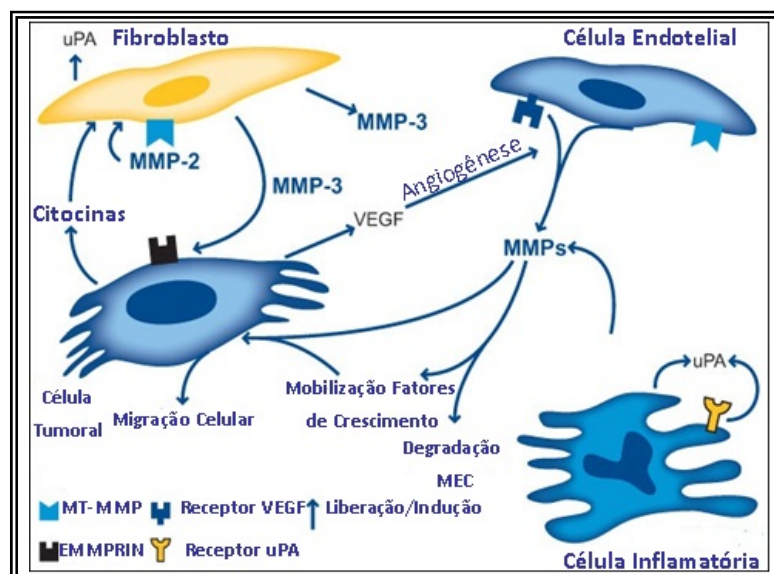


Figura 7. **Relação MMP, célula tumoral e célula endotelial.** Extraído e modificado <http://www.abcam.com>. Acesso: 05/17/2011.

1.1.4 Angiogênese

No crescimento do tumor primário, o aumento da massa tumoral ocasionado pela alteração do mecanismo de proliferação das células tumorais proporciona uma redução na tensão de O₂ desencadeando um estado de hipóxia local (MERCURIO *et al.*, 2004; STELLER-STEVENSON, 2008).

A hipóxia é uma condição capaz de selecionar as células tumorais mais resistentes, normalmente apresentando a proteína p53 mutada, o que as tornam resistentes à morte celular (CHUNG; MERCURIO, 2004). Além disso, fatores pró-angiogênicos presentes na MEC do estroma tumoral como VEGF e FGF2 são liberados nessa condição induzindo tanto as células tumorais quanto os fibroblastos associados a sintetizarem MMPs capazes de degradarem a MEC, além da proliferação das células endoteliais facilitando o desenvolvimento da angiogênese tumoral (CHUNG; FERRARA, 2010).

A angiogênese é a formação de novos vasos, sanguíneos e linfáticos, como resultado do balanço entre fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos que regulam as atividades das células endoteliais (CASANOVAS *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2008; BERGER *et al.*, 2010) (figura 8). Diversos estados, patológicos ou não, apresentam a angiogênese como um aspecto importante no desenvolvimento.



Figura 8. **Cascata de eventos da Angiogênese.** Extraído e modificado: <http://www.angio.org>. Acesso: 05/17/2011.

O VEGF-A é uma das moléculas pró-angiogênicas mais importantes na indução da angiogênese tumoral pela ligação aos receptores VEGFR1 e VEGFR2 presentes na superfície das células endoteliais, estimulando a proliferação das células endoteliais assim como sua migração e a formação do tubo vascular (BERTIN *et al.*, 2010).

As células endoteliais normalmente expressam a integrina $\alpha\beta3$ em sua superfície celular, no entanto a sua expressão na angiogênese tumoral é estimulada aumentando a adesão das células endoteliais à MEC e quando estimuladas pelo VEGF secretado pelas células tumorais, são capazes de proliferarem e migrarem para formação de novos vasos. Associação entre fatores de crescimento e integrinas ocorre em diversos outros processos tais como migração e proliferação (PDGF e integrina $\alpha\beta3$), migração e angiogênese (bFGF e integrina $\alpha\beta3$ e $\alpha5\beta1$) (ELICEIRI;CHERESH, 2001; COOPER; CHAY; PIENTA, 2002; DAVIS;SENGER, 2005). A angiogênese tumoral favorece o crescimento do tumor primário pelo suprimento de nutrientes, O_2 e gera a oportunidade das células tumorais desprenderem deste sítio e colonizarem outro local distante (LI *et al.*, 2008).

Além disso, Bachelder e colaboradores (2002) reportaram a presença de receptores para VEGF também em células de câncer de mama, inicialmente restrito as células endoteliais, e que a ligação do VEGF com o seu receptor nessas células aumenta a sobrevivência celular pela ativação da via de sinalização da PI3-kinase/Akt através de uma via de sinalização autócrina, além de estimular a migração celular (RIA *et al.*, 2010).

1.1.5 Metástase

A metástase é um evento de disseminação de células tumorais de um sítio primário até um ambiente distante (nicho pré-metastático ou sítio secundário) onde os fatores de crescimento e citocinas do tumor primário, por exemplo, foram capazes de aumentar a expressão de VEGFR1 (YILMAZ; CHRISTOFORI; LEHEMBRE, 2007). Deste modo, a cascata metastática clássica é formada pelo intravasamento das células tumorais, a circulação nos vasos sanguíneos ou linfáticos, o extravasamento dos vasos e o crescimento no novo órgão, distante do tumor primário (HAYASHIDA *et al.*, 2011) (figura 9).

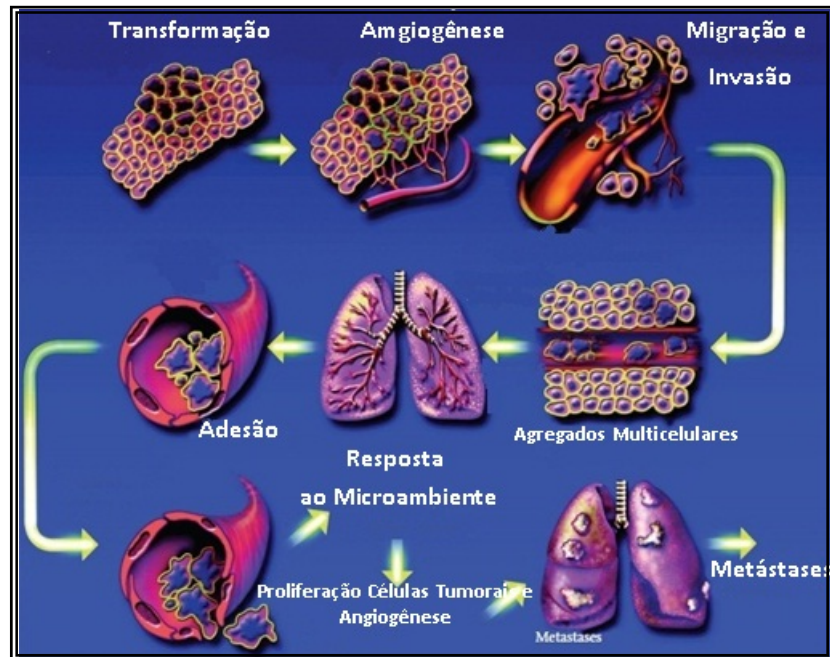


Figura 9. **Cascata metastática.** Eventos e moléculas participantes do processo metastático. Extraído e modificado ARSHAD *et al.*, 2011.

Durante o intravasamento, as células tumorais perdem as características epiteliais e adquirem características mesenquimais como disfunção das interações adesivas célula-célula, reestruturação do citoesqueleto, perda da polaridade apical e alterações morfológicas. Essa transição epitélio-mesenquimal (TEM) contribui para migração e invasão do microambiente ao redor dos vasos facilitando o intravasamento celular, uma das etapas do processo metastático (KALLURI; ZEISBERG, 2006; HAYASHIDA *et al.*, 2011). Além disso, células tumorais em transição epitélio-mesenquimal adquirem resistência à apoptose, uma vantagem durante a metástase (YAGI; YOTSUMOTO; MIYAMOTO, 2008).

Essa TEM é induzida por citocinas e quimiocinas como TGF- β liberado pelas próprias células tumorais. Na frente migratória tumoral, essas células produzem MMP, principalmente MMP-9, degradando a MEC e facilitando a invasão (YILMAZ; CHRISTOFORI; LEHEMBRE, 2007). Essas células podem apresentar diferentes tipos de processos migratórios, de individual a coletivo. Independentemente da migração, célula por célula isolada e dispersa ou por um conjunto de células aderidas, o processo migratório através dos tecidos adjacentes é dinâmico na sua sequência de eventos.

Em resposta a um estímulo, a célula tumoral forma uma protrusão da sua membrana plasmática na qual há receptores celulares, principalmente integrinas que estão ativadas nessa condição.

A célula aderida à MEC via integrina ativa a sinalização para migração por meio da fosforilação da FAK permitindo a polimerização da actina e assim gerando uma polarização do citoesqueleto celular com a formação das fibras de estresse, que irão permitir a tração da célula pela retração celular gerada pela degradação dos contatos adesivos e reciclagem das integrinas na frente migratória para assim reiniciar o processo permitindo a migração celular em direção a um gradiente quimioatraente (YILMAZ; CHRISTOFORI; LEHEMBRE, 2007; ULRICH; HEISENBERG, 2009).

Na presença de MMP-9, cuja expressão é induzida pelos fatores presentes no microambiente tumoral como TGF- β , EGF, TNF- α e ativação ocorrendo pela ligação à integrina $\alpha\beta 3$ altamente expressa nessa condição tanto por células tumorais quanto células endoteliais, a MMP-9 acaba mediando a liberação de outro fator, o VEGF. Esses dois fatores associados, MMP-9 e VEGF, contribuem para o processo de invasão estromal e para a angiogênese, facilitando o intravasamento das células tumorais tanto pela degradação da MEC dos vasos quanto pelo aumento da permeabilidade vascular (STUELTEN *et al.*, 2005; THIOLLOY *et al.*, 2009).

No interior dos vasos, durante o transporte das células tumorais até um sítio distante do tumor primário, as células tumorais ficam expostas a forças mecânicas do fluxo sanguíneo além do contato com proteínas plasmáticas e células do sangue. Dentre elas, as células citotóxicas chamadas *natural killer* (NK) são as principais responsáveis pela eliminação das células tumorais presentes no interior dos vasos. No entanto, outro elemento do sangue, as plaquetas, bloqueia a destruição das células tumorais pelas células NK e de fatores como TNF- α circulante aderindo-se através de receptores celulares às células tumorais formando uma capa protetora (GOMES *et al.*, 2004; JAIN; HARRIS; WARE., 2010).

Os co-agregados formados pelas plaquetas e células tumorais ocorrem por meio das integrinas, principalmente através da interação da integrina $\alpha IIb\beta 3$ das plaquetas com um dos seus ligantes como fibrinogênio, fator de von Willebrand e da ligação da integrina $\alpha\beta 3$ das células tumorais neste complexo (GOMES *et al.*, 2004). As P-selectinas encontradas na superfície das plaquetas também podem participar da adesão direta das plaquetas as células tumorais. A inibição desse receptor em experimento animal demonstrou redução na formação de metástase (JAIN; HARRIS; WARE., 2010).

As plaquetas não apenas ajudam na sobrevivência das células tumorais na corrente sanguínea como também auxiliam na adesão transiente dessas células ao endotélio

vascular facilitando o extravasamento para o sítio metastático uma vez que estocam moléculas como MMP-2, MMP-9, VEGF, PDGF, EGF entre outros que degradam o subendotélio e aumenta a permeabilidade vascular (JAIN; HARRIS; WARE., 2010).

Algumas vezes é visto que as células tumorais acabam aderindo-se às células endoteliais do interior do vaso e neste mesmo local se proliferam e não extravasando para outro sítio, formando neste local um tumor secundário. No entanto, o extravasamento pelos vasos é a etapa principal da metástase. Neste momento, as células tumorais ajudadas pelas plaquetas aderem às células endoteliais. Pela liberação de citocinas e fatores de crescimento há um rearranjo no citoesqueleto das células endoteliais, perda de adesão célula-célula e a formação de espaços na monocamada de células endoteliais facilitando a transmigração das células tumorais pelos vasos e invadindo a MEC do tecido adjacente (MIERKE *et al.*, 2008).

No sítio secundário, preparado pelas citocinas e fatores de crescimento do tumor primário, as células tumorais estabelecem novas interações permitindo adesão celular no novo ambiente, sobrevivência e proliferação o que é necessário para promover o crescimento e a progressão tumoral (MIERKE *et al.*, 2008)

O microambiente tumoral é apresentado como um ambiente ativo metabolicamente, rico em moléculas, células e eventos importantes do desenvolvimento tumoral. Zhang e colaboradores (2009) afirmaram que o entendimento do mecanismo metastático, das moléculas e vias de sinalizações envolvidas neste processo são essenciais para o desenvolvimento de terapias preventivas e curativas. Neste sentido, há décadas inibidores angiogênicos vêm sendo extensamente estudados tendo em vista o papel fundamental da angiogênese no desenvolvimento e progressão tumoral (ZHANG *et al.*, 2009).

A identificação das etapas fundamentais no processo metastático e das principais moléculas participantes tornou-se alvo do desenvolvimento de fármacos na tentativa de exercer o controle do processo, como é o caso do Aggrastat, Integrelin.

Atualmente diversas moléculas estão sendo estudadas para atuarem no microambiente tumoral sendo as integrinas as principais moléculas alvo. A integrina $\alpha 5\beta 1$ é alvo para volociximab, a vilaxin atua sobre a integrina $\alpha v\beta 3$, o cilinetide age sobre as integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$, o bevacizumab atua sobre VEGF e é atualmente o único aprovado pelo FDA (YU; MOUW; WEAVER., 2010). A maioria desses compostos são anticorpos monoclonais, que atualmente são as principais moléculas utilizadas nas terapias anti-

angiogênica e anti-metastática. No entanto, há diversas outras moléculas capazes de interagirem com as integrinas, as desintegrinas são uma delas.

1.2 Peçonha de Serpente _ fonte de Biomoléculas ativas

A fauna e a flora, especialmente a brasileira, podem ser comparadas a indústrias altamente produtivas de moléculas bioativas capazes de atuar em diversas doenças, servindo de modelo para desenvolvimento de novos fármacos visto o conhecimento gerado pelas toxinas sobre a fisiologia humana (KARALLIEDDE, 1995).

Em especial, os venenos de serpentes compreendem uma mistura complexa de moléculas, enzimas e peptídeos ativos. Dois indivíduos da mesma espécie de serpente podem apresentar diferenças na composição de seus venenos influenciada pela região geográfica, pela sazonalidade, por ser fêmea ou macho Além disso, os venenos apresentam variações entre gêneros e famílias de serpentes (BJARNASON; FOX, 1989; LEWIS *et al.*, 2003; ROCHA; FURTADO, 2005).

Dentre as serpentes peçonhentas, a família Viperidae compreende 180 espécies (GONZÁLEZ-RIVERA *et al.*, 2009). O gênero *Bothrops* é o mais importante dentre as serpentes peçonhentas no Brasil e em 2009 com base em dados morfológicos e genes mitocondriais propiciou uma reclassificação deste gênero com base filogenética, na qual o gênero *Bothrops* ficou restrito à *Bothrops atrox* e surgiu o gênero *Bothriopsis* para *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops jararaca* e o restante do grupo foi denominado *Rhinocerophis* e em especial a espécie *Bothrops alternatus* passou a ser denominada *Rhinocerophis alternatus* (figura 10) (FENWICK *et al.*, 2009).

A *Rhinocerophis alternatus* é encontrada no sudeste, sul e centro-oeste brasileiro, região central da Argentina e região meridional do Uruguai e habita ambientes úmidos (ROCHA; FURTADO, 2005).



Figura 10. *Bothrops alternatus*. Espécime do gênero *Bothrops*, família Viperidae. Extraído: <http://www.venomousreptiles.org>

A peçonha botrópica promove edema local seguido de necrose além de hemorragias. Estudos com esse tipo de veneno indicam a existência de baixa atividade casenolítica e fibrinolítica (ROCHA; FURTADO, 2005).

Na natureza, a peçonha da serpente é utilizado para a imobilização e digestão da presa, sendo secretado e armazenado nas glândulas de veneno (MENEZES *et al.*, 2006). Na área clínica, é fonte única de moléculas capazes de atuarem auxiliando no tratamento de alguma doença tornando-se modelos estruturais no desenvolvimento de novos fármacos, por exemplo, captopril, Integrilin, Aggrastat.

1.2.1 Metaloproteases de Veneno de Serpente (SVMP)

Uma classe de toxinas altamente expressas no veneno de *Bothrops* são as metaloproteases. Essas proteínas atuam na MEC dos vasos sanguíneos provocando hemorragia local e sistêmica, uma das consequências da inoculação do veneno. Análise proteômica do veneno da *Bothrops alternatus* identificou que as metaloproteases representam 50% das proteínas do veneno bruto sendo o restante dividido pelas serinoproteases, fosfolípases A2, L-aminoácido oxidase, inibidores de trombina (ÖHLER *et al.*, 2010).

As metaloproteases de veneno de serpentes, denominadas SVMPs (**S**nake **V**enom **M**etallo**p**rotease), são metaloproteases dependentes de zinco constituintes do grupo reprotisinas e juntamente com outras metaloproteases como serralisina, astacina e MMPs, fazem parte da superfamília das Metzincinas. Essas proteases além do motivo de ligação ao zinco HEXXHXXGXXH apresentam uma metionina na conformação *Met-turn* na região C-

terminal ao motivo de ligação ao zinco. As famílias são distinguidas pelos resíduos posteriores a terceira histidina ligante de zinco e os resíduos ao redor do *Met-turn* (HOOPER, 1994).

No grupo das reprotolisinas outro membro são as ADAMs (**A Disintegrin and Metaloprotease**), glicoproteínas transmembrana de mamíferos implicada na adesão célula-célula e célula-MEC. Estruturalmente são similares à classe P-III das SVMPs (ver abaixo) com domínio adicional tipo EGF além do domínio transmembrana e citoplasmático (KLEIN ;BISCHOFF, 2011). Funcionalmente, participa de processos adesivos através do seu domínio desintegrina- rico em Cys quanto de processos proteolíticos com o seu domínio catalítico (ZINGRINO; ROSWITHA; MAUCH, 2011).

As SVMPs são metaloproteases multi-modulares, sintetizadas na forma de zimogênios, ou seja, na forma de propeptídeo com um grupo tiol bloqueando a ligação do sítio catalítico de ligação ao zinco ao substrato. A remoção do grupo tiol acontece por processamento proteolítico ativado pelo pH ácido no momento da secreção da glândula venenífera (HO *et al.*, 2002; FOX ;SERRANO, 2008).

Inicialmente, as SVMPs foram classificadas em quatro grupos estruturalmente diferentes, P-I, P-IIa-b, P-IIIa-b e P-IV baseado no número de domínios protéicos adicionais ao domínio catalítico codificados por cada classe de RNAm. A classe P-I representa as SVMPs com apenas o domínio metaloprotease (catalítico), a classe P-II tem um domínio desintegrinas com sequência adesiva K/RGD adicional ao domínio metaloprotease, a classe P-III são as SVMPs com domínio rico em cisteína localizado na região C-terminal do domínio tipo desintegrina com sequência adesiva D/ECD e a classe P-IV apresenta um domínio tipo lectina adicional a C-terminal do domínio rico em cisteína (BJARNASON; FOX, 1994; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006). No entanto em estudos de transcriptoma e proteômica dos venenos, observou-se a presença ou ausência de domínios não catalíticos comparando transcritos e proteínas e, por exemplo, notou-se que a classe P-IV surge de uma modificação pós-traducional da sequência do transcrito da classe P-III. Deste modo, uma nova classificação foi proposta por Fox e Serrano (2008) (figura 11).

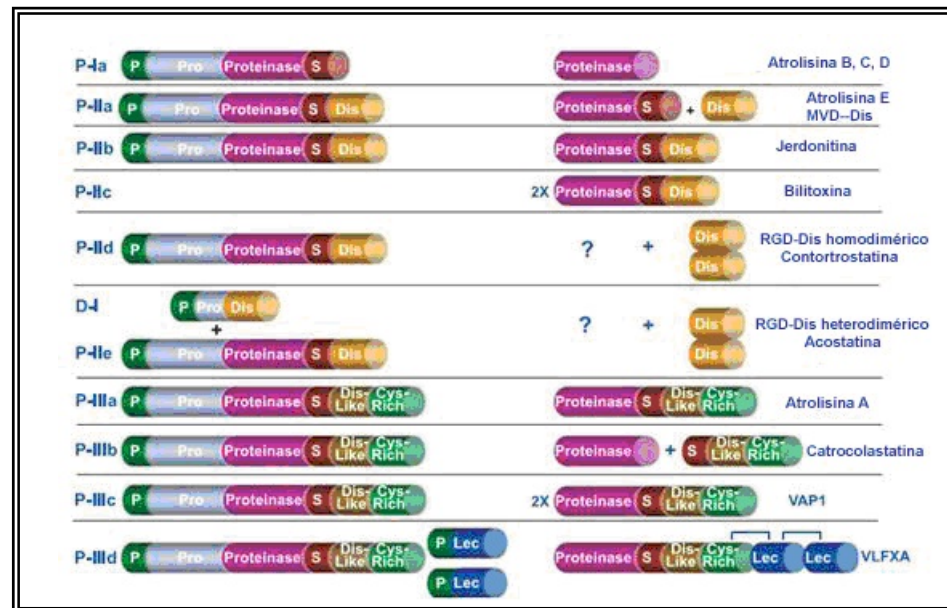


Figura 11. **Representação esquemática da nova classificação das SVMPs proposta por Fox e Serrano (2008).** Extraído e modificado de FOX ; SERRANO (2008).

As SVMPs com atividade enzimática apresentam o mecanismo *cisteína-swicth*, no qual a cisteína presente na sequência conservada PRCGVDP no propeptídeo se liga a molécula de zinco no domínio catalítico, o mesmo observado na ativação das metaloproteases de matriz (CAWSTON, 1996).

A estrutura básica do RNAm das SVMPs codifica um peptídeo sinal com resíduos altamente conservados e na sua maioria hidrofóbicos sendo uma marca de secreção protéica. Em seguida, um pro-domínio de aproximadamente 200 aminoácidos modulador da atividade catalítica do domínio metaloprotease ou catalítico composto por cerca de 215 resíduos de aminoácidos com a sequência conservada de ligação ao zinco e apresentam de duas a três pontes de dissulfeto, sendo a terceira encontrada em estruturas que apresentam domínios adicionais a C-terminal do domínio metaloprotease. Adicionalmente pode ser observado um peptídeo espaçador de 13-15 resíduos de aminoácidos ligando os domínios metaloprotease e desintegrina. O domínio desintegrina e tipo desintegrina variam em comprimento (41-100 aminoácidos) e número de pontes de dissulfeto (4-8). No caso das proteínas da classe P-II, este domínio pode ser liberado do domínio metaloprotease e se ligar às integrinas através do seu motivo adesivo RGD. O domínio tipo desintegrina encontrado na classe P-III apresenta sequências alternativas no motivo adesivo (D/ECD). O domínio rico em cisteína tem aproximadamente 112 resíduos de aminoácidos e também apresenta papel adesivo as integrinas (JIA *et al.*, 1996; RAMOS;SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006; FOX ; SERRANO, 2008).

1.2.2 Desintegrinas

As desintegrinas são peptídeos solúveis derivados das SVMPs, ricos em cisteína, sem atividade enzimática, apresentam homologia no arranjo das cisteínas na estrutura primária e são os mais potentes inibidores conhecidos da função das integrinas através do motivo adesivo RGD presente no topo da alça localizada na região C-terminal da molécula (GOULD *et al.*, 1990; KNIGHT *et al.*, 2007) (figura 12).

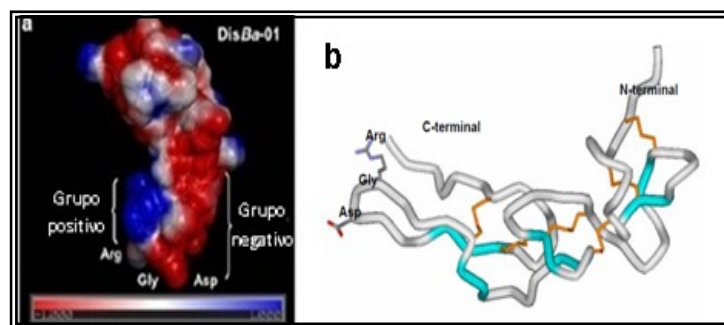


Figura 12. **Desintegrina de *Bothrops alternatus* (DisBa-01)**. A: Potencial eletrostático, em azul a região dos aminoácidos carregados positivamente e em vermelho a região dos aminoácidos carregados negativamente e em cinza os aminoácidos neutros; B: Modelo estrutural da DisBa-01, ponte de dissulfeto em laranja, folhas betas em azul, Carbono em cinza. Extraído e modificado de RAMOS, 2005 e RAMOS *et al.*, 2008.

O número de pontes de dissulfeto, o comprimento da molécula e a presença de dimerização são critérios usados na classificação das desintegrinas em 5 grupos: pequenas (41-51 aminoácidos e 4 pontes de dissulfeto), médias (aproximadamente 70 aminoácidos e 6 pontes de dissulfeto), grandes (84 aminoácidos e 7 pontes de dissulfeto), homo/heterodiméricas (4 pontes de dissulfeto intracadeia e 2 pontes de dissulfeto intercadeia) e proteínas *tipo* desintegrinas (derivado da classe P-III das SVMPs) (CALVETE *et al.*, 2003).

O conhecimento da relação da sequência RGD presente em proteínas da MEC e sua interação com integrinas e o fato do fibrinogênio apresentar esse motivo e interagir com a integrina α IIb β 3 das plaquetas permitiu a identificação do sítio ativo das desintegrinas, uma vez que elas são capazes de inibir a agregação plaquetária (MARCINKIEWICZ, 2005).

A capacidade das desintegrinas de exercerem a sua atividade inibitória da função das integrinas além da potência dessa ligação depende tanto da formação das pontes de dissulfeto permitindo o estabelecimento conformacional correto da alça contendo a sequência tripeptídica RGD quanto dos aminoácidos flanqueadores do sítio adesivo, conferindo graus diferentes de afinidade e seletividade (GOULD *et al.*, 1994).

A echistatina isolada do veneno da *Echis carinatus* e a obtustatina do veneno da *Vipera lebetina obtusa* são dois exemplos de desintegrinas pequenas, a primeira apresenta o motivo adesivo RGD e a segunda o motivo adesivo KTS. A echistatina interage com as integrinas α IIb β 3, α v β 3, α 5 β 1 inibindo além da agregação plaquetária, a migração e proliferação celular ativada por essas integrinas. Já a obtustatina pela interação com a integrina α 1 β 1 interfere no processo de proliferação celular (MCLANE *et al.*, 2004).

A salmosina (*Gloydius saxatilis*), uma desintegrina grande com motivo adesivo RGD, inibe a agregação plaquetária além da proliferação de células de melanoma murino sem interferência na proliferação das células endoteliais, suprimindo o crescimento tumoral (KIM *et al.*, 2003).

A alternagina-C do veneno de *Bothrops alternatus* é uma proteína tipo desintegrina com motivo adesivo ECD capaz de reconhecer a integrina α 2 β 1 e induzir migração de neutrófilos, proliferação de células HUVEC além da expressão de VEGF e seu receptor R2 e indução de angiogênese *in vivo* (MARIANO-OLIVEIRA *et al.*, 2003; COMINETTI *et al.*, 2004; RAMOS *et al.*, 2007). No entanto, muitos estudos relatam que a capacidade adesiva desse tipo de desintegrina ocorre pela colaboração dos dois domínios, tanto o tipo desintegrina quanto o rico em cisteína (SERRANO *et al.*, 2006).

As desintegrinas médias são as mais numerosas, trigamina, flavoridina, kistrina (rodostomina), barbuorina, são alguns dos exemplos e são capazes de inibem a adesão das células HUVEC a fibronectina e vitronectina através da interação do motivo RGD ou no caso da barbuorina com o motivo KGD com a integrina α v β 3 (MCLANE *et al.*, 2004). No geral, há diferentes motivos adesivos (KTS, MLD, D/ECD, K/RGD) encontrados tanto nas desintegrinas monoméricas quanto diméricas interagindo com diferentes integrinas e desempenhando papel variado nos processos celulares.

As desintegrinas RGD inicialmente tornaram-se foco de estudo devido ao seu papel de inibidor da agregação plaquetária através da interação com a integrina α IIb β 3 em

desordens relacionadas a formação de trombos. A existência de outras desordens como doenças cardíacas, artrite reumatóide, doença de Alzheimer, câncer entre outras relacionadas com integrinas dependentes da ligação RGD, como as integrinas $\alpha\beta3$ e $\alpha5\beta1$ despertou interesse em avaliar o potencial clínico deste tipo de molécula (VAN GOLEM *et al.*, 2002; MARCINKIEWICZ, 2005).

Especialmente no câncer, muitos processos são dependentes das integrinas ligantes de moléculas RGD como migração, proliferação, apoptose, angiogênese, além disso, existe um aumento da expressão desses receptores na superfície de células endoteliais e tumorais, sendo uma marca de identificação de transformação tumoral (RIA *et al.*, 2010). Estudos realizados com a contortostatina (CN), uma desintegrina RGD homodimérica, identificaram a capacidade de inibir a adesão de osteoclastos através do bloqueio da integrina $\alpha5\beta1$ além de bloquear adesão, migração e invasão de diversos tipos de células tumorais e células endoteliais por meio da integrina $\alpha\beta3$ (LI *et al.*, 2010). Já a salmosina apresenta uma atividade anti-proliferativa de células de melanoma relacionado ao efeito pro-apoptótico do bloqueio da integrina $\alpha\beta3$ (MARCINKIEWICZ, 2005).

Outro estudo também com desintegrina RGD, a saxatilina, apresentou juntamente com a capacidade de inibir a agregação plaquetária, a inibição da angiogênese e metástase pulmonar de células de melanoma (KIM *et al.*, 2007).

Apesar do grande interesse da área farmacológica nesse tipo de efeito promovido por essas moléculas que até já resultou no uso da estrutura delas como molde no desenvolvimento de drogas como é o caso do Integrilin® (sítio ativo da desintegrina barbuorina) relacionada com a síndrome coronariana aguda (MARCINKIEWICZ, 2005), as desintegrinas não são encontradas em grandes proporções nos venenos. Uma das soluções é a produção em sistemas recombinantes os quais são capazes de gerar grandes quantidades de proteínas (ZHOU *et al.*, 2000; SÁNCHEZ *et al.*, 2010). Essas desintegrinas recombinantes mantêm as características as quais tornaram as desintegrinas naturais interessantes farmacologicamente. A desintegrina RGD recombinante r-mojastina-1 inibe a agregação plaquetária induzida por ADP e inibe a adesão das plaquetas a fibronectina (SÁNCHEZ *et al.*, 2010). A vicrostatina, uma quimera entre a echistatina e a contortostatina recombinante apresenta efeitos semelhantes ao da contortostatina nativa na inibição da agregação plaquetária como também migração de células tumorais (MINEA *et al.*, 2010).

Nosso laboratório vem produzindo com sucesso em *E.coli* (BI21(DE3)) utilizando o sistema pET28a, uma desintegrina RGD recombinante de *Bothrops alternatus* (DisBa-01) fusionada com *histag*, de aproximadamente 12 kDa, 112 aminoácidos (34 aminoácidos do peptídeo de fusão e 78 aminoácidos do domínio desintegrina) e 6 pontes de dissulfeto. Esta desintegrina é potente inibidor da agregação plaquetária e da adesão de células de melanoma murino e células endoteliais, além de inibir a angiogênese e metástase pulmonar *in vivo* juntamente com a inibição da migração de células tumorais (RAMOS *et al.*, 2008; KAUSKOT *et al.*, 2008; SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2010). O seu potencial de molécula anti-metastática é confirmado pela capacidade de reduzir a expressão de VEGF e seu receptor em células endoteliais e modular a atividade da MMP-9 (MONTENEGRO *et al.*, dados não publicados).

No entanto, proteínas recombinantes apresentam problema de imunogenicidade promovida pelos peptídeos de fusão que auxiliam na solubilidade e no isolamento da proteína. Neste sentido, esforços na redução da imunogenicidade da molécula como eliminação do peptídeo de fusão e a manutenção das características positivas do uso do sistema recombinante são essenciais no estudo das desintegrinas visto que peptídeos sintéticos apesar de serem muito utilizados em pesquisa, apresentam menor potência nos efeitos quando comparados com as desintegrinas (MILLARD; ODDE; NEAMANTI, 2011).

2. Objetivos

Capítulo 1

O objetivo neste capítulo foi identificar o papel da DisBa-01 nas etapas do processo de extravasamento de células tumorais.

Capítulo 2

Fundamentado nos resultados demonstrados em estudos com a DisBa-01 ao longo dos últimos anos e no interesse que esta molécula desperta com a sua possível aplicação farmacêutica, este trabalho objetivou estudar a molécula da desintegrina sem o peptídeo de fusão de polihistidinas (*His-tag*) e, analisar a atividade dessa desintegrina em etapas do processo metastático.

Os objetivos específicos foram:

- * Clonagem da desintegrina-RGD de *Bothrops alternatus* sem o peptídeo de fusão (alternatina _ ATN);
- * Produção dessa proteína recombinante em *E. coli*;
- * Produção de anticorpos policlonais anti-DisBa-01 em coelhos para detecção da proteína recombinante;
- * Purificação da desintegrina recombinante;
- * Caracterização Bioquímica da molécula;
- * Realização de testes da atividade biológica da proteína recombinante em ensaios celulares *in vitro*.

CAPÍTULO 1
EFEITOS DA DISBA-01 NO PROCESSO DE EXTRAVASAMENTO
TUMORAL

3. Materiais e Métodos

3.1 Produção da DisBa-01

A obtenção da desintegrina RGD recombinante de *Bothrops alternatus*, DisBa-01, foi realizada segundo protocolo estabelecido em nosso laboratório (Ramos *et al.*, 2008). Brevemente, uma colônia de *E.coli* BL21 (DE3) transformada com o plasmídeo pDisBa foi crescida overnight em meio de cultivo seletivo com canamicina (30µg/ml) a 37°C a 250 rpm. No dia seguinte, o caldo de bactéria foi diluído 1/50 em meio de cultivo seletivo novo e atingida a D.O.₆₆₀ entre 0.4-0.6, a indução da expressão da proteína recombinante foi realizada com 0,5mM de IPTG (isopropil-β-D-1 thiogalactopiranosídeo). Após 3 horas de indução a 37°C e 250 rpm, a cultura foi centrifugada em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5C Plus), por 5 minutos a 407 xg. O precipitado foi ressuspenso em tampão A (Tris 40mM, NaCl 0,5M, imidazol 5,0mM) e as bactérias lisadas por 6 pulsos de ondas de ultrassom com o auxílio de sonicador (Vibracell) com os seguintes parâmetros: tempo: 1 minuto, amplitude: 20 hertz, intervalo de 30 segundos entre as séries. Em seguida, o lisado bacteriano foi novamente centrifugado a 4°C durante 15 minutos a 2863 xg. O sobrenadante 1 (S1) foi separado e guardado para posterior análise de seu conteúdo e o precipitado ressuspendido em tampão A, acrescido de 6M de uréia. Novamente, 6 pulsos de ultrassom foram realizados com os mesmos parâmetros anteriores e após 30 minutos de incubação em gelo, o material lisado foi centrifugado a 2863 xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante 2 (S2) foi então guardado para análise de seu conteúdo em SDS-PAGE. O sobrenadante desnaturante (S2) foi utilizado para a purificação da DisBa-01. Primeiramente, foi realizada uma cromatografia de afinidade ao níquel com gradiente isocrático de imidazol (5mM-1M) em solução desnaturante (contendo uréia 6M). As frações com a desintegrina (baseada na massa molecular) foram reunidas, dialisadas 1X contra uréia 3M e 3X contra água bidestilada com auxílio de um saco de diálise de MWCO de 2 kDa. Em seguida, um segundo passo de purificação foi realizado, por cromatografia de troca iônica em coluna aniônica MonoQ 5/50 GL (GE Lifesciences). As amostras puras obtidas desse processo de purificação foram então reunidas, novamente dialisadas 2X contra água bidestilada e 1X contra PBS e utilizada nos ensaios celulares.

3.2 Quantificação Protéica

A determinação da concentração de proteína foi realizada utilizando o kit colorimétrico *BCA™ Protein Assay Kit* (PIERCE) baseado na atividade do ácido bicinônico (BCA) para detecção colorimétrica e quantificação de proteína total. Uma curva padrão com a proteína soro albumina bovina (BSA) foi realizada a cada quantificação juntamente com as amostras a serem quantificadas e a reação colorimétrica obtida foi lida a 540 nm em leitor de placa (Dynex). As absorbâncias da reação, referentes à curva padrão, foram plotadas e determinada a equação da reta para a subsequente determinação das concentrações protéicas das amostras.

3.3 Linhagens Celulares e Cultura

A linhagem de melanoma murino, B16F10, e a linhagem celular de câncer de mama, MDA-MB-231, sendo esta transfectada com **pGFP** (plasmídeo com gene da proteína verde fluorescente) ou **pLuciferase**, foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado com 10% v/v de SFB (soro fetal bovino), 100UI/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina e 2mM de glutamina. Para as células transfectadas, o meio foi acrescido de gentamicina. As células endoteliais de cérebro humano (hCMEC/D3) foram mantidas em meio EBM-2 (Endothelial Basal Medium - 2), suplementado com 2,5% SFB, 1% de estreptomicina, 10mM de HEPES, 0,55µM de hidrocortisona e 1ng/ml bFGF. Todas as células foram mantidas em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 37°C. Para todos os ensaios, as células foram descoladas com solução de EDTA 0,1%.

3.4 Determinação de Monocamada de Células Endoteliais de Cérebro Humano (hCMEC/D3)_Imunomarcção de proteína de junções celulares

Os experimentos com células endoteliais de cérebro humano e células de câncer de mama foram realizados no Institut Cochin-Paris, no laboratório da Dra. Clara Nahmias (Inserm U567).

Diferentes quantidades de células (1×10^4 e 3×10^4) foram plaqueadas sobre insertos em placas de 12 poços recobertos com matrigel para a determinação do número celular capaz de formar camada única de células endoteliais de cérebro humano (hCMEC/D3). A verificação da existência de camada única ou multicamadas ocorreu através de imunomarcção das proteínas presentes nas junções celulares e visualização em microscópio confocal Sp2 (Leica TCS Sp2 AOBS).

Os insertos foram primeiramente fixados com PAF (paraformaldeído) 3% durante 10 minutos e posteriormente deixados em PBS durante 16 horas. No dia seguinte, os insertos foram permeabilizados com Triton X-100 0,1% durante 10 minutos a temperatura ambiente e então lavados duas vezes com PBS durante 5 minutos. Em seguida, o filtro contendo as células foi retirado do inserto com o auxílio de uma pinça e colocado com a face opaca (face contendo as células) em contato com a solução de bloqueio BSA 3% em PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a fase de bloqueio, o filtro foi incubado com anticorpo anti-ZO-1 (zônula ocludente 1) (Zymed), 1/100 em BSA 3% por 1 hora protegido da luz. Três rápidas lavagens com PBS foram realizadas após o período de incubação com o anticorpo primário e, foi realizada uma nova incubação de 1 hora com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen), 1/200. Passado o tempo de incubação, os filtros foram lavados rapidamente 3 vezes com PBS, secos, montados entre lâmina e lamínula contendo glicerol com DAPI (Sigma) (1/1000) e armazenados a -20°C protegidos da luz. Posteriormente foram visualizados em microscópio confocal Leica TCS Sp2 AOBS.

3.5 Dosagem de Luciferase

Em uma placa de 96 poços branca, cada poço contendo o material a ser dosado em temperatura ambiente recebeu 20 μl de solução de lise (25mM Tris-fosfato pH 7.8; 2mM DTT; 2mM CDTA; 10% glicerol; 1% Triton X-100) presente no kit Luciferase Assay (Promega). Conforme recomendações do fabricante foram adicionados 100 μl /poço de substrato para luciferase e a medida foi realizada em luminômetro Apollo LB 911 (Berthold).

3.6 Ensaios de Adesão Celular

3.6.1 Condição de Fluxo

Este experimento foi realizado no Hôpital Saint Louis, Inserm U553, sob orientação do Dr. Michel Crépin como parte do plano de trabalho elaborado para realização de estágio no exterior.

Células tumorais de melanoma murino na concentração de 10^7 células/ml foram marcadas com *cell tracker* vermelho CPMTX (Invitrogen) por 30 minutos e, posteriormente, incubadas com diferentes concentrações da DisBa-01 (0; 10; 100; 1000 nM) por mais 30 minutos a 37°C em estufa umidificada com 5% CO₂.

O sangue total obtido de doadores humanos saudáveis foi coletado em tubos heparinizados (13 IU/ml) e centrifugado por 20 minutos a 200 x g para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP), o qual foi marcado com 5µg/ml de calceína verde AM (Invitrogen) durante 30 minutos a 37°C.

O PRP marcado foi misturado com as células vermelhas do sangue na proporção em volume de 1:1,5. Lâminas previamente cobertas com colágeno tipo I ou colágeno tipo III (2,5 mg/ml) foram colocadas na câmara de perfusão e a mistura de PRP e células sanguíneas com as células tumorais marcadas (proporção 1:10 em volume) foram perfundidas pelo sistema durante 10 minutos a 1.500 sec^{-1} , utilizando bomba peristáltica. Em seguida, as lâminas foram lavadas durante 5 minutos com PBS utilizando o mesmo fluxo e 15 campos aleatórios foram escolhidos usando microscópio epifluorescente (Nikon Eclipse TE 300). O software Scion Visiocapture Image Acquisition Application foi utilizado para aquisição das imagens. A superfície recoberta de plaquetas e células de cada campo fotografado foi contada usando software Image J.

3.6.2 Condição Estática _ Adesão Célula-Célula

O ensaio foi realizado em placa de 96 poços. Estes foram sensibilizados com 100 µl de uma solução de colágeno tipo I (100ng/ml) por 1 hora a 37°C em estufa de CO₂

umidificada. Em seguida, o colágeno não polimerizado foi aspirado e 5×10^3 células endoteliais em meio de cultivo apropriado com 10% SFB foram adicionadas aos poços e incubadas em estufa umidificada a 37°C com 5% CO_2 . Após 24 horas, período para atingir a confluência nos poços, o meio de cultivo das células endoteliais foi substituído por meio fresco sem SFB por 24 horas. Após esse período, as células tumorais de câncer de mama transfectadas com luciferase e pré-tratadas com DisBa-01 (0 ou 100 nM) foram plaqueadas sobre as células endoteliais na concentração de 1×10^5 células/poço. Após 30 minutos de adesão entre as células, o meio de cultura foi retirado dos poços, os quais foram lavados 3 vezes com PBS sendo então adicionado tampão de lise do kit Luciferase Assay. Após 1 hora, foi realizada a leitura da luminescência. Os experimentos foram realizados em quadruplicata, em três experimentos individuais.

3.7 Ensaio de Transmigração Celular

Para o ensaio de transmigração endotelial de células tumorais, foram semeadas $1,5 \times 10^4$ células endoteliais de cérebro humano (hCMEC/D3) no interior da câmara de Boyden modificada (BD), sensibilizada com 100 μl colágeno tipo I (100ng/ml) para a formação de monocamada de células endoteliais. Os insertos foram mantidos em estufa umidificada a 37°C com 5% CO_2 com meio de cultivo contendo 10% SFB na face inferior e superior da câmara de Boyden por 24 horas. Após esse período, o meio de cultivo foi substituído por um meio novo sem SFB e deixado por mais 24 horas em estufa de CO_2 a 37°C . No dia seguinte, o meio do compartimento inferior da câmara de Boyden foi trocado por meio DMEM com 0 ou 100 ng/ml de SDF-1 α (fator-1 α derivado de célula estromal). Na face superior, foram semeadas 1×10^5 células tumorais transfectadas com luciferase ou GFP e tratadas com a desintegrina. Após 16 horas, as células tumorais que permaneceram na face superior da câmara, foram retiradas com o auxílio de um cotonete e, as células na face inferior foram lisadas com tampão de lise 1X do kit de leitura de luciferase. Posteriormente foi realizada a mensuração em luminômetro ou as células foram fixadas com PAF 3%, lavadas com PBS 1X e o filtro montado entre lâmina e lamínula com glicerol gel e DAPI. Fotos em campos aleatórios em cada filtro foram obtidos com o auxílio de microscópio confocal Leica Sp5 e as células foram contadas com auxílio do software Image J.

3.8 Análise Estatística

Os experimentos foram realizados pelo menos em triplicata para análises de média, erro padrão e deste modo podendo ser aplicados os testes estatísticos pertinentes às variâncias (ANOVA ONE WAY ou teste t) considerando aceitáveis os valores $p < 0,05$ e os resultados validados pelo teste Dunnett do programa computacional Graphpad InStat v.3 (GraphPadSoftware, San Diego, CA, USA).

4. Resultados

4.1 *DisBa-01 afeta a adesão de células de melanoma murino em condição de fluxo*

Há alguns anos foi demonstrada a atividade inibitória da *DisBa-01* quanto a adesão estática das células de melanoma murino ao substrato vitronectina com IC_{50} de 225 nM (RAMOS *et al.*, 2008). Dando continuidade aos estudos, em condição de fluxo, onde simulamos o fluxo arterial com o auxílio de uma bomba peristáltica com velocidade de cisalhamento de 1500 sec^{-1} (Gomes *et al.*, 2004), a mesma desintegrina em todas as concentrações testadas (10, 100 e 1000 nM) inibiu significativamente a adesão das células B16F10/A7 ao colágeno tipo I ($60.8\% \pm 4,4\%$; $76.63\% \pm 1,98\%$; $66.83\% \pm 1,59\%$, respectivamente) (Figura 13 A e 14 A-D). No entanto, a *DisBa-01* foi capaz de inibir a formação de agregados plaquetários ao colágeno tipo I ($33.75\% \pm 3.93\%$) apenas na concentração de 10 nM (figura 13 B).

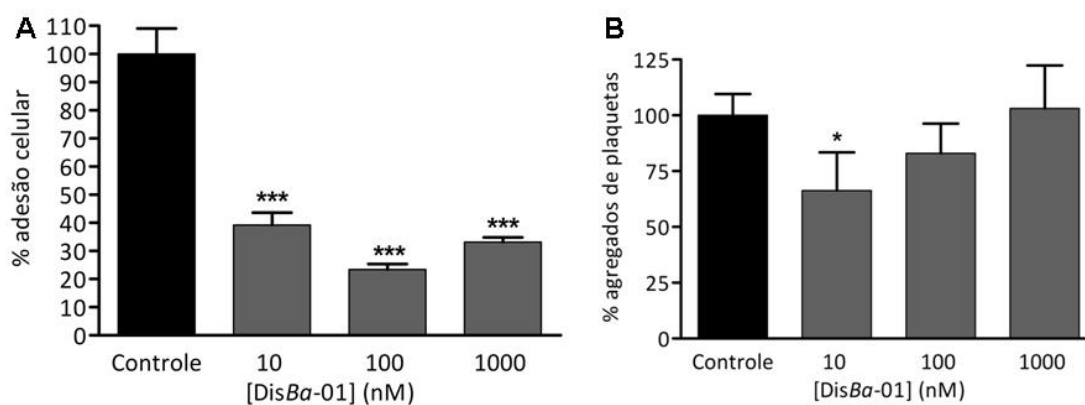


Figura 13. Inibição da adesão de células de melanoma murino e plaquetas ao colágeno tipo I em condição de fluxo. Células marcadas (10^7 células/ml) foram incubadas por 30 minutos com *DisBa-01* (10, 100, 1000 nM) ou PBS (controle). Células tumorais (A) e plaquetas (B) foram mensuradas por análise de imagens obtidas de 15 campos aleatórios em cada lâmina usando o software Image J. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão de 3 experimentos independentes. Análise estatística foi realizada usando teste de Dunnett * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

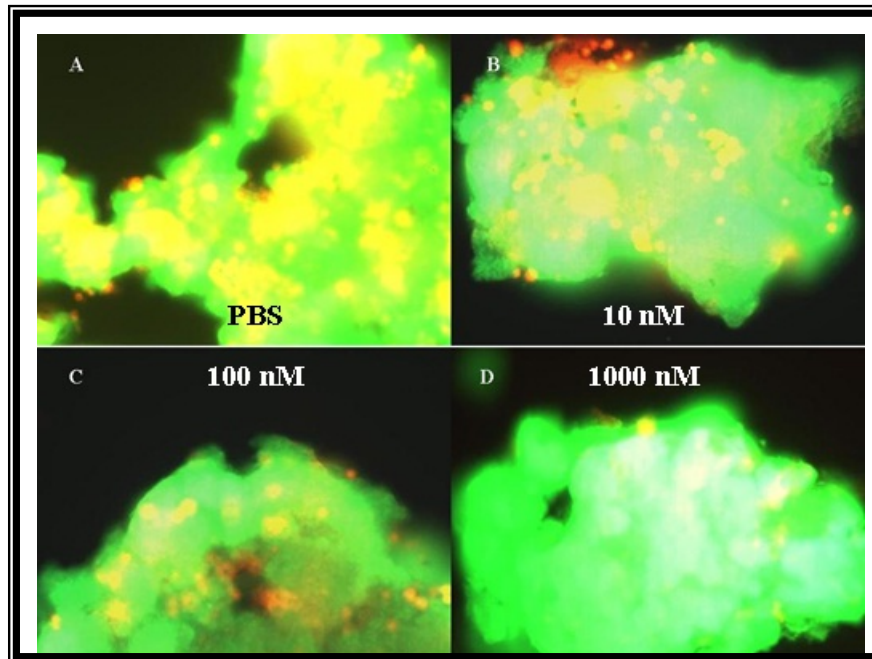


Figura 14. Inibição da Adesão de células de melanoma murino e plaquetas ao colágeno tipo I em condição de fluxo. Células marcadas (10^7 células/ml) foram incubadas por 30 minutos com DisBa-01 (10, 100, 1000 nM) ou PBS (controle) e adicionadas a sangue total, preparado na diluição de 1:5 com PRP marcado com calceína. A mistura de células e sangue foi perfundida (1500 sec^{-1}) por 10 minutos sobre lâminas cobertas por colágeno tipo I (A-D).

No mesmo sistema de fluxo, agora utilizando colágeno tipo III como substrato, não houve alteração na formação dos agregados com relação as células de melanoma murino B16F10/A7, exceto na concentração de 10 nM de DisBa-01 que foi capaz de estimular a adesão celular ($69,4 \% \pm 2,65\%$) (Figura 15 A) nem mesmo quando as plaquetas foram ativadas (figura 15 B).

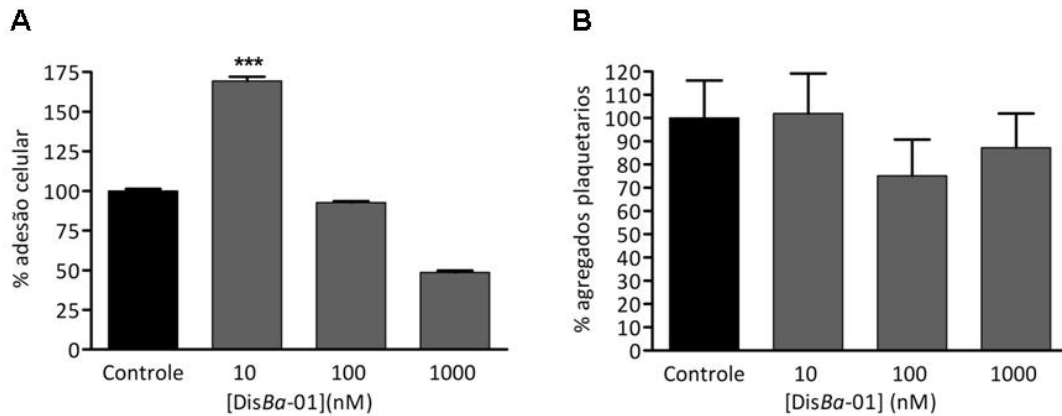


Figura 15. Na menor concentração em condição de fluxo, DisBa-01 aumenta a adesão das células tumorais ao colágeno tipo III. Células marcadas (10^7 cells/ml) foram incubadas por 30 minutos com DisBa-01 (10, 100, 1000 nM) ou PBS (controle) e adicionadas ao sangue total, preparado na diluição de 1:5 com PRP marcado com calceína. Células tumorais (A) e plaquetas (B) foram mensuradas por análise de imagens obtidas de 15 campos aleatórios em cada lâmina usando o software Image J. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão de 3 independentes experimentos. A análise estatística foi realizada usando teste de Dunnett *** $p < 0,001$

4.2 Formação da Monocamada Celular de hCMEC/D3 e suas junções celulares

Duas diferentes concentrações celulares foram utilizadas para a criação da monocamada celular de células hCMEC/D3 (figura 16). No entanto, na menor concentração, foi visível a formação de falhas no tapete celular (figura 16 A) e na maior concentração, multicamadas celulares foram estabelecidas (figura 16 B). Foi então decidido o uso de 150.000 células para insertos de 12 poços (figura 16 C).

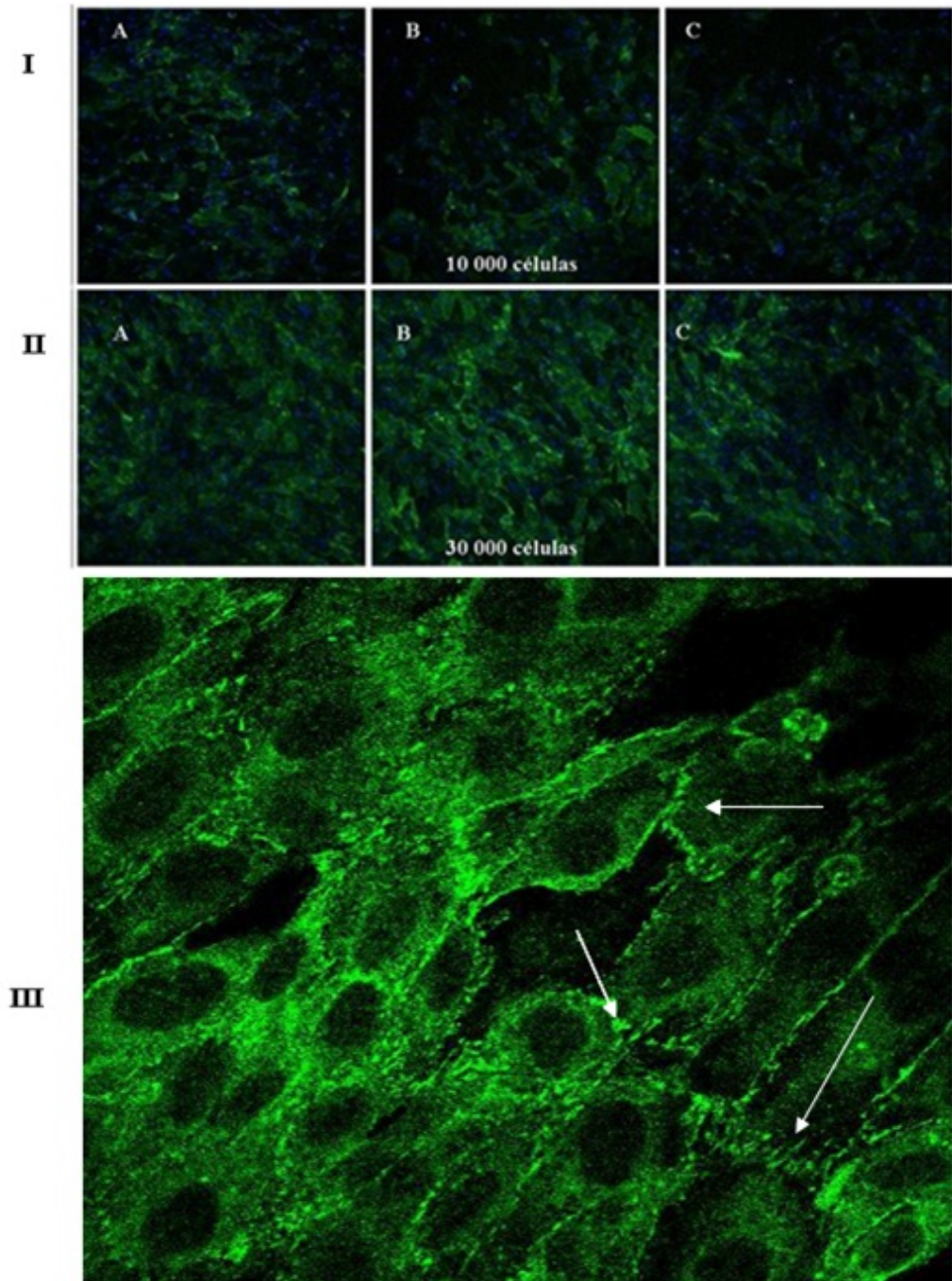


Figura 16. Determinação de Monocamada Celular da linhagem hCMEC/D3. Insertos em placa de 12 poços foram sensibilizados com colágeno tipo I e após polimerização, duas quantidades celulares, 1×10^4 células (A) e 3×10^4 células (B) foram plaqueadas para a determinação do melhor número celular, onde se formou uma monocamada uniforme (C) $1,5 \times 10^4$ (microscopia confocal). Para a visualização do estabelecimento das conexões celulares foi utilizado anticorpos para junção celular ZO-1 (setas brancas), típica de células endoteliais cerebrais.

4.3 Efeito da DisBa-01 na adesão das células tumorais nas células endoteliais cerebrais

Uma única concentração de DisBa-01 foi testada nos experimentos com células endoteliais. Na concentração de 100 nM, a DisBa-01 apresentou uma tendência a redução de 36,7% da adesão das células de câncer de mama MDA-MB-231 Luc comparada com o controle em (figura 17) sem diferença estatística. Outras concentrações deveriam ter sido testadas o que poderia nos mostrar o perfil de ação da desintegrina nesse tipo de evento celular.

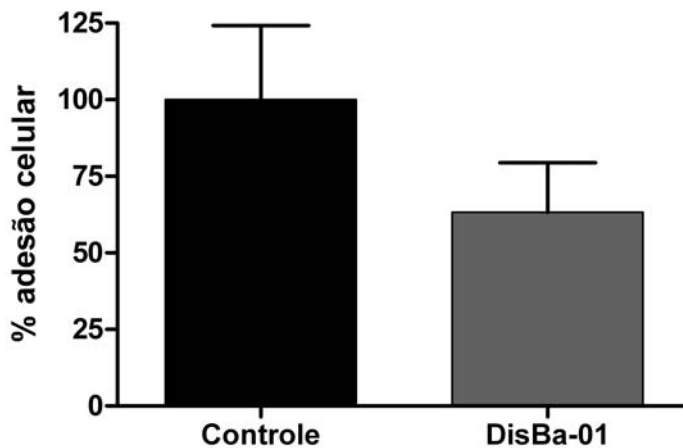


Figura 17. Efeito da DisBa-01 na adesão de células tumorais a células endotelial cerebral. Células de câncer de mama, MDA-MB-231 transfectada com luciferase, foram pré-incubadas com 100 nM de DisBa-01 por 30 minutos antes de serem plaqueadas sobre células endoteliais de cérebro humano previamente aderidas ao poço da placa de 96 poços. Após 1 hora, as células não aderidas foram removidas dos poços e as células tumorais que aderiram as células endoteliais foram lisadas e adicionado luciferina para reação enzimática e mensurada em luminômetro. teste t e pós-hoc Mann-Whitney.

4.4 Efeito da DisBa-01 na transmigração endotelial de células MDA-MB-231

Como no ensaio anterior, utilizando 100 nM de DisBa-01 no tratamento das células tumorais MDA-MB-231 GFP ou MDA-MB-231 Luc, uma tendência a redução de 28,7% e 22,12% foi observada respectivamente na migração pela monocamada endotelial cerebral (figura 18), sem diferença estatística.

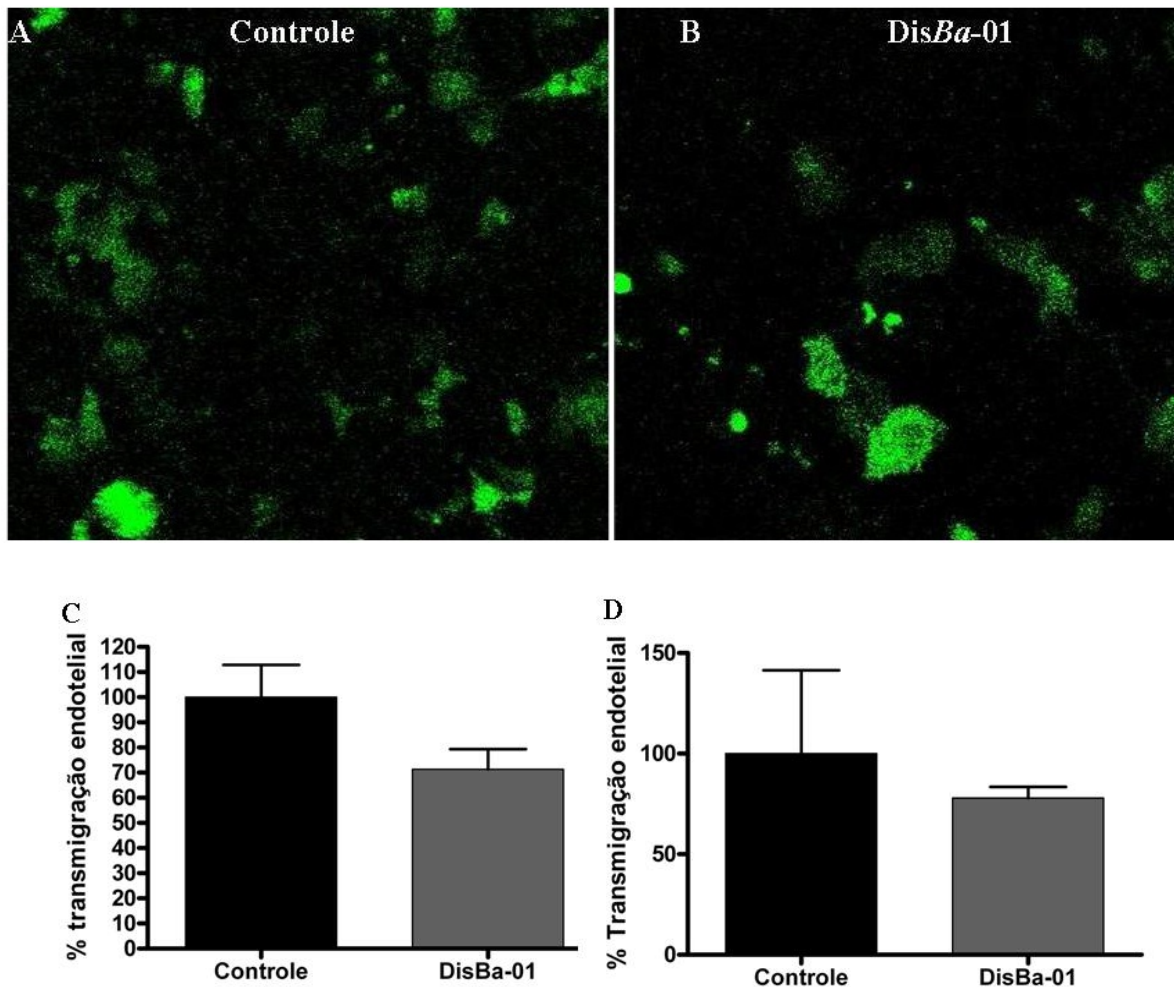


Figura 18. Migração transendotelial de células tumorais MDA-MB-231. Células MDA-MB-231 transfectadas com GFP (A,B,C) ou luciferase (D) foram pré-incubadas com 100 nM de DisBa-01 por 30 minutos e plaqueadas na parte superior do inserto previamente recoberto com uma monocamada de células endoteliais de cérebro humano e deixados por 24 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂. As células tumorais migratórias encontradas na face inferior do inserto foram contadas (C) ou foram lisadas (D) e mensuradas em luminômetro. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão de 3 experimentos independentes. teste t e pós-hoc Mann-Whitney.

5. Discussão

Uma das principais etapas do desenvolvimento metastático é a sobrevivência das células tumorais na corrente sanguínea, escapando das células NKs (natural killers), responsáveis pela identificação de células estranhas ao organismo e sua eliminação do interior dos vasos. Um mecanismo desenvolvido pelas células tumorais é a associação com plaquetas, elemento de ocorrência natural no ambiente vascular, formando uma capa protetora tornando-se inacessíveis as células NK, semelhantemente ao que ocorre com as plaquetas em adesão ao colágeno dos vasos em injúrias vasculares no estabelecimento da hemostase (POLANOWSKA-GRABOWSKA *et al.*, 2003). Normalmente neste mecanismo, as plaquetas aderem-se ao colágeno presente no subendotélio vascular (rico em colágeno tipo I, III e IV) através da ligação da integrina $\alpha 2\beta 1$ ou pela GPVI. Pelo mecanismo *inside-out* a integrina $\alpha IIb\beta 3$ é ativada e se liga ao fator de vonWillebrand ou ao fibrinogênio ou outra proteína RGD presente no plasma que pode interagir com outra plaqueta desencadeando a agregação plaquetária (WIJEYEWICKREMA *et al.*, 2005). Na presença das células tumorais diversos estudos sustentam a hipótese de que a ligação a segunda plaqueta é substituída pela ligação à célula tumoral estabelecendo a interação entre a integrina $\alpha IIb\beta 3$ das plaquetas e a integrina $\alpha v\beta 3$ presente nas células tumorais (COMINETTI, M.R. *et al.*, 2009).

No ensaio onde mimetizamos a condição encontrada no interior dos vasos, simulando o fluxo sanguíneo arterial com uso de bomba peristáltica e a presença de sangue total e células tumorais de melanoma murino, foi verificada a inibição da adesão das células B16F10 tratadas com a desintegrina RGD recombinante na presença de colágeno tipo I imobilizado, em todas as concentrações testadas. Este fato sugere então o bloqueio das integrinas $\alpha v\beta 3$ e/ou $\alpha 5\beta 1$ pela DisBa-01 impossibilitando a ligação destas integrinas ao conjugado colágeno-plaqueta-fator de vonWillebrand/fibrinogênio. Isto corrobora com os dados de Ramos e colaboradores (2008) que analisando a interação entre células de melanoma e plaquetas por citometria de fluxo observaram uma redução na formação dos conjugados. Cominetti e colaboradores (2009) utilizando o mesmo sistema de fluxo, mas estudando o efeito da ADAM9D em células de câncer de mama MDA-MB-231, também observaram a inibição da adesão dessas células e das plaquetas ao colágeno tipo I. Segundo os pesquisadores, apesar da ADAM9D não inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno tipo I, o efeito da desintegrina em sistema de fluxo era decorrente do bloqueio da integrina $\alpha v\beta 3$ das células MDA-MB-231 pela ADAM9D. Já no caso do colágeno tipo III, a DisBa-01

na menor concentração não foi eficiente no bloqueio dos receptores RGD-dependentes, ao invés disso, favoreceu a adesão das células de melanoma, provavelmente em razão da baixa concentração da desintegrina, esta então não foi capaz de impedir o estabelecimento dos conjugados plaquetas e células tumorais e deste modo a adesão desses agregados ao colágeno tipo III imobilizado foi favorecido, assim como pode ter deixado as células de melanoma em contato com a proteína de matriz permitindo a adesão, uma vez que a principal integrina mediadora da adesão celular das células de melanoma é a integrina $\alpha 2\beta 1$, ligante de colágeno (STANISZWASKA, I. *et al.*, 2009). Outra possibilidade é a ativação de outros tipos de receptores capazes de promover a adesão ao colágeno tipo III, já que a interação com colágeno não é apenas dependente de integrina, há glicoproteína VI, ddr1 e ddr2, família de receptores para manose, receptor-1 de leucócito associado tipo Ig (LEITINGER AND HOHENESTER, 2007).

A ausência de efeito da desintegrina nas plaquetas neste sistema de fluxo tanto com colágeno tipo I quanto colágeno tipo III pode ser devido ao fato da desintegrina ter sido direcionada para atuar sobre as células tumorais através de uma prévia incubação, não sendo possível mensurar o quanto de desintegrina estava disponível para atuar sobre as plaquetas no momento da simulação do fluxo sanguíneo arterial. No entanto sabemos que utilizando PRP humano e de camundongos a DisBa-01 inibe a agregação induzida por colágeno de ambos os tipos plaquetários com IC₅₀ 701 nM e 235 nM respectivamente, um efeito característico de desintegrinas RGD e de ação da desintegrina nas plaquetas (KAUSKOT *et al.*, 2008). No entanto, a DisBa-01 pode não interferir na adesão das plaquetas ao colágeno assim como a Tablysina-15, uma desintegrina RGD presente na glândula salivar de *Tabanus yao* semelhantemente à DisBa-01 inibe a agregação plaquetária e a formação de trombos e não é capaz de interferir na adesão das plaquetas ao colágeno (MA, D. *et al.*, 2011).

Além da adesão das células tumorais presentes no fluxo sanguíneo às células endoteliais, o processo de extravasamento, limitante para o desenvolvimento de metástase, também conta com a migração transendotelial das células tumorais. A transmigração das células tumorais pela monocamada endotelial leva a alteração dos receptores celulares das células endoteliais (MIERKE *et al.*, 2008) e a colonização no nicho metastático.

As células endoteliais cerebrais são uma das células constituintes da chamada barreira sangue-cérebro (*Blood Brain Barrier*_BBB). A estrutura principal deste sistema são as *tight junctions* que são complexos intramembranosos constituídos por 3 proteínas integrais

(occludina, claudina, e JAM) e o estabelecimento destas junções previne a passagem paracelular de pequenas moléculas. Um dos tipos de metástase desenvolvida por células tumorais de mama é a metástase localizada no cérebro (ARSHAD *et al.*, 2011), normalmente com prognóstico ruim devido aos problemas de difusão das drogas antitumorais pela barreira hemato-encefálica criada pelos tipos de adesões estabelecidas pelas células endoteliais cerebrais.

Neste estudo observou-se uma tendência de redução da adesão e da transmigração das células MDA-MB-231 pelas células endoteliais cerebrais incubadas com DisBa-01, mostrando a importância dos receptores bloqueados pela desintegrina RGD neste processo, os quais são essenciais no extravasamento das células tumorais livres na circulação sanguínea pelo endotélio cerebral (ARSHAD *et al.*, 2011). Dentre os membros da classe das integrinas, a $\alpha\beta3$ participa dos principais eventos relacionados a invasão tumoral (MA, D. *et al.*, 2011), o que torna a redução da transmigração das células MDA-MB-231 pela DisBa-01 um resultado importante apesar da ausência de significância estatística. Corroborando com a redução da transmigração das células MDA-MB-231 pela DisBa-01 estão os dados obtidos por Selistre-de-Araujo e colaboradores (2010) e Montenegro e colaboradores (dados não publicados), que observaram a inibição da migração de células MDA-MB-231 tratadas com DisBa-01, apesar do aumento da atividade da MMP-9 associada a célula tumoral. No entanto, não apenas os receptores dependentes de ligantes RGD são essenciais neste processo visto que a desintegrina KTS, visperostatina e a metaloprotease VP12 mostraram a importância de outros dois receptores, a integrina $\alpha1\beta1$ e $\alpha2\beta1$, na capacidade invasiva de células tumorais, uma vez que células de melanoma que não expressavam a integrina $\alpha\beta3$ tiveram a sua transmigração pelas células endoteliais inibida por essas moléculas (STANISZWSKA, I. *et al.*, 2009).

Montenegro e colaboradores (dados não publicados) observaram redução da expressão de VEGF e dos receptores VEGFR1 e VEGFR2 das células HUVEC, o que poderia ocasionar numa redução da permeabilidade das células endoteliais induzidas por VEGF. Em células endoteliais cerebrais, o VEGF livre no estroma aumenta a permeabilidade celular através da ligação à VE-caderina, uma caderina responsável pela adesão celular das células endoteliais e que pode ser bloqueada por um inibidor de VEGFR2 (ARSHAD *et al.*, 2011). Neste sentido, a inibição da migração das células MDA-MB-231 juntamente com a redução da permeabilidade corroboram com a redução da transmigração das células tumorais pelas células endoteliais cerebrais encontrada nesse trabalho.

Os efeitos da DisBa-01 observados em eventos da cascata metastática dependentes de receptores RGD *in vitro* permitem o uso desta molécula mais efetivamente em modelos *in vivo* de indução de metástase para avaliar a possibilidade de ser esta uma molécula candidata para o desenvolvimento de uma nova droga bloqueadora de integrina $\beta 3$ já que diversos estudos ressaltam a inibição de processos mediados pela integrina $\alpha v\beta 3$.

CAPÍTULO 2
ESTUDOS COM ATB NAS DIVERSAS ETAPAS DO PROCESSO
METASTÁTICO

6. Materiais e Métodos

6.1 Subclonagem da ATN

Como estratégia para a obtenção do DNA da desintegrina a ser subclonada foi realizada primeiramente a extração do plasmídeo pDisBa (pET28aDisBa-01) das bactérias *E.coli* BL21(DE3) segundo instrução do fabricante do kit Wizard Plus Miniprep (Eppendorf). Após confirmação da presença do plasmídeo na amostra, foi realizada a amplificação do fragmento de DNA que codifica a desintegrina DisBa-01 utilizando os seguintes oligonucleotídeos adicionados de sítios de restrição para as enzimas *NcoI* e *EcoRI* respectivamente:

forward : 5'-CATGCCATGGGGAAATGAACTTTTGGAGGCGGGAGAA-3'
NcoI

reverse: 5'-CGCGAATTCTTAGGCATGGAAGGGATT-3'
EcoRI

Os primers foram baseados na seqüência inicial e final da desintegrina DisBa-01 depositada no GENBANK com número de acesso AY 259516.

A reação de polimerização realizada pela DNA polimerase seguiu as seguintes condições:

Tabela 1: Componentes da Reação de PCR

<i>Componentes da reação de PCR</i>	<i>Volume (µl)</i>
<i>Água</i>	16,75
<i>Tampão 10X</i>	2,5
<i>MgCl₂ 25mM</i>	0,75
<i>dNTPs 10mM</i>	0,5/cada
<i>Oligonucleotídeo Forward (10µM)</i>	1,0
<i>Oligonucleotídeo Reverse (10µM)</i>	1,0
<i>DNA Molde</i>	0,5
<i>Taq DNA Polimerase</i>	0,5

O programa utilizado para a amplificação do fragmento de DNA foi configurado no termociclador (Perkin Elmer 2400) da seguinte maneira:

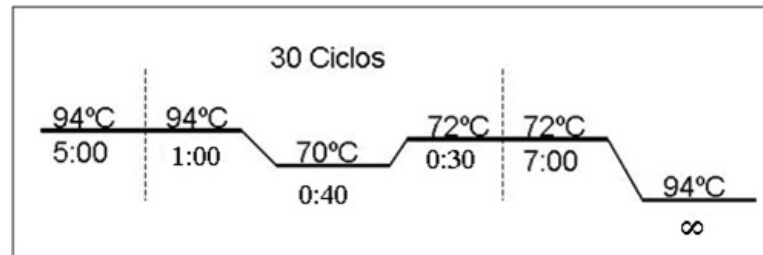


Figura 19: Ciclo do Programa de PCR. Amplificação da desintegrina RGD de *Bothrops alternatus*.

A visualização da amplificação do produto da PCR e da pureza da reação foi obtida através de eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo.

O produto da amplificação foi tratado com as enzimas *NcoI* e *EcoRI* durante 16 horas a 37°C em banho maria e purificado a partir do gel de agarose 1% com o uso de kit de extração de agarose (Eppendorf). Após eletroforese o vetor pET 28a (figura 20) também passou pelo mesmo tratamento criando extremidades coesivas semelhantes às do DNA do inserto podendo então ser ligado pela ação da T4 DNA ligase (Invitrogen) na proporção de 3:1 (inserto:vetor) pelo período de 16 horas a 16°C. O plasmídeo resultante pATN foi então inserido em cepas de bactérias da linhagem DH5-*a* de *E.coli* para propagação do plasmídeo. Os clones resultantes resistentes à canamicina foram selecionados e o plasmídeo extraído para confirmação da clonagem por meio da análise de restrição com as mesmas enzimas usadas para a obtenção das extremidades do inserto e do vetor. Depois de confirmada a clonagem, o plasmídeo pATN foi utilizado para transformar a cepa de bactéria da linhagem BL21(DE3) de *E.coli* para produção da proteína recombinante.

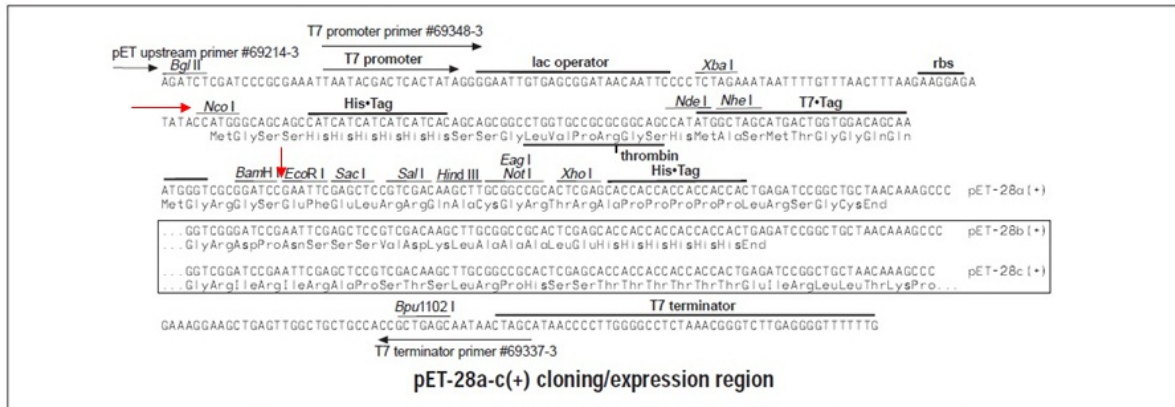


Figura 20. Mapa do vetor pET28a (Novagem). Setas em vermelho indicam os sítios de clonagem onde a desintegrina foi inserida.

6.2 Seqüenciamento de DNA

Os produtos das ampliações por PCR do cDNA da desintegrina e os plasmídeos resultantes das reações de subclonagem foram submetidos à análise das seqüências de DNA por seqüenciamento automático realizado no Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP) sob supervisão do professor Dr. Otávio H. Thiemann. Os oligonucleotídeos utilizados para o seqüenciamento dos produtos de PCR foram os mesmos utilizados para a amplificação. A concentração dos oligonucleotídeos para o seqüenciamento foi de 5 pmol por reação e 250 ng de plasmídeo por reação.

6.3 Caracterização Bioquímica da Alternatin(ATN)

6.3.1 Expressão e Solubilidade da ATN

Culturas de *Escherichia coli* BL21(DE3) pATN foram crescidas em meio LB (Sigma, USA) seletivo com canamicina (30 µg/ml) a 37°C e agitação de 250 rpm durante 16 horas. Após esse período, essa cultura foi diluída 1:25 (v/v) em LB contendo canamicina (30 µg/ml) (Sigma, USA) e incubada a 37°C sob agitação de 250 rpm até alcançar uma D.O_{660nm} 0.5-0.8. Neste momento, foi retirada uma amostra T0 de 1ml para a verificação da expressão protéica basal. O restante da cultura em fase logarítmica de crescimento teve a

expressão induzida pela adição de IPTG, um indutor artificial do promotor Lac presente no vetor de expressão pET 28a na concentração final de 1,0 mM durante 3 horas sob agitação de 250 rpm a 37°C. Após três horas de indução, uma amostra de 1 ml denominada T3 foi retirada e passou pelo mesmo procedimento da amostra T0 (descrito mais adiante). O restante da cultura foi centrifugado por 5 minutos a 407 x g a 4°C (Sorvall RC 5C Plus), o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em tampão de ligação (1/5 do volume inicial) (Tris 40mM, NaCl 0,5M, Imidazol 5,0mM). As células foram lisadas através de sonicação (10 pulsos de 1 minuto cada, com amplitude de 20).

A cultura de células lisadas foi centrifugada (15 minutos, 2863 x g, 4°C) e o sobrenadante solúvel (S) guardado para análise de solubilidade da proteína recombinante. Uma amostra do S foi retirada e acrescida de tampão de amostra com betamercaptoetanol. O restante do sobrenadante solúvel foi filtrado em papel filtro (Whatman) e guardado a 4°C.

As amostras retiradas durante todo o processo de expressão e solubilização da ATN (T0, T3, S) foram centrifugadas a 16.110 x g durante 1 minuto, o sobrenadante descartado e as células foram ressuspensas em água estéril e tampão de amostra (2:1) (Tris 125mM, pH 6.8, SDS 4% (m/v), glicerol 20%, 0,02% de azul de bromofenol (m/v) e β -mercaptoetanol 0,1M), fervidas durante 5 minutos, e analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e submetidas à reação de imunodeteção por *Western Blotting*.

6.3.2 Purificação da proteína ATN

O sobrenadante foi concentrado em liofilizador (Thermo) para um volume de 5% em relação ao volume do S e então dialisado contra 20 volumes de tampão Tris 10mM e NaCl 150mM pH 8,6 em membrana de diálise com *cut off* de 2 kDa sendo que a cada 1 hora o tampão em questão era trocado por um novo, repetindo esse procedimento 5 vezes. Após a diálise, o sobrenadante passou por uma cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 HiLoad 16/60 (GE Lifescience) com o tampão acima referido, monitorado pela leitura da absorbância em 280 nm, fluxo de 1ml/minuto e as frações coletadas a cada 3 minutos. Estas foram analisadas por SDS-PAGE e *western blotting* e as frações contendo a proteína em questão foram reunidas, concentradas e novamente submetidas a uma segunda cromatografia de exclusão molecular com os mesmos parâmetros, mas utilizando agora a

coluna Superdex 75 Hiload (GE Lifescience). As frações contendo a proteína pura identificadas por SDS-PAGE e *western blotting* foram reunidas, concentradas e dialisadas contra tampão Tris 20mM pH 8.6 para a retirada do sal NaCl e preparar a proteína para cromatografia de troca iônica, em coluna catiônica MonoQ 5/50 GL (GE Lifescience), fluxo 1ml/mim, leitura monitorada a 280 nm em sistema Akta Basic (GE Lifescience) (4 mL 0 %B; 1 mL 0-10%B; 3mL em 10%B; 1 mL 10-30%B; 12 mL em 30%B; 9mL 30-100%B; 4mL em 100%B). As frações obtidas com 30% de NaCl 1M pH 8.6 foram reunidas, concentradas e dialisadas com o uso do sistema de filtração Centricon 30. As amostras de ATN pura foram então dialisadas contra PBS 1X em saco de diálise de 2 kDa.

6.4 Produção de Anticorpos Policlonais

A produção de anticorpos policlonais foi realizada utilizando-se uma coelha fêmea. Cerca de 100 µg do antígeno (DisBa-01) foi emulsionada com uma solução de mesmo volume de adjuvante de Freund completo (Sigma). Esta emulsão foi injetada intradermicamente no dorso do animal. Após 45 dias, uma segunda inoculação agora de 10 µg do antígeno (DisBa-01) foi realizada. Desta vez, a inoculação foi intraperitoneal sem adjuvante e, passados 10 dias da segunda injeção, o sangue da coelha foi coletado por punção venosa sem anticoagulante.

6.4.1 Titulação dos Anticorpos Policlonais

O sangue coletado foi centrifugado em baixa rotação 5000 rpm (Centrifuge 5804R, Eppendorf) por 10 minutos e o sobrenadante (soro) foi coletado e armazenado para a titulação. O soro armazenado foi diluído em TBST em diversas proporções para que o título desses anticorpos fosse encontrado.

As diluições dos anticorpos testados foram: 1:500; 1:1000; 1:2000; 1:4000; 1:8000; 1:16000 e 1:32000. Os testes desses anticorpos foram feitos através de ELISA com uma massa única de proteína (5µg) nos poços variando-se foi apenas a diluição dos anticorpos. Em placa de 96 poços (Corning), 5 µg do antígeno, DisBa-01, em 100 µl/poço em solução de carbonato de sódio 50 mM pH 9,6 foi deixada durante 12 horas a 4°C. Passado

esse tempo, os poços foram lavados 4 vezes com PBS (tampão fosfato-salino). Em seguida, 100ul/poço de BSA dissolvidos em PBS foram adicionados e deixados no poço por 12 horas a 4°C. No dia seguinte, essa solução foi retirada dos poços, que foram então lavados 4 vezes com PBS e incubados com diferentes proporções de anticorpos anti-DisBa-01 durante 1 hora em estufa a 37°C. Passado esse tempo, os anticorpos foram retirados dos poços, estes foram lavados com TBST (TBS contendo Tween 20) e incubados por 2 horas a 37°C com anti-IgG de coelhos. Depois desse tempo, a placa foi retirada da estufa, os anticorpos secundários retirados dos poços, esses foram lavados com TBS T 4 vezes e aos poços foi adicionada uma solução preparada 30 minutos antes de alcalina fosfatase para ELISA. A placa foi incubada durante 1 hora no escuro e feita a leitura de absorbância em 520 nm em leitor de ELISA Dynex.

6.4.2 Purificação da Fração de IgG do Soro de Animais Imunizados

A precipitação das γ globulinas foi realizada em etapas. Inicialmente, o soro não diluído e sob suave agitação constante a 4°C teve as proteínas com carga positiva precipitadas pela adição por gotejamento de sulfato de amônio a 33% pH 7,8. Após um período de 3 horas sob agitação constante, o soro precipitado foi centrifugado durante 30 minutos a 1157 x g a 15°C. As proteínas precipitadas foram dissolvidas em PBS em igual volume do soro inicial. Posteriormente foram realizadas mais 2 séries de precipitações e centrifugações como descrito acima. Na terceira série de precipitação, o precipitado protéico foi dissolvido em metade do volume inicial, dialisado contra água e posteriormente contra PBS. Essa amostra foi aplicada em coluna de afinidade Sepharose proteína A equilibrada previamente com PBS. Após a absorbância atingir o zero, a fração de IgG ligada a coluna foi eluída com tampão glicina 0,1M pH 2,5. As frações foram neutralizadas com NaOH 1M.

6.4.3 Coluna de Afinidade de Anticorpos

Dois gramas de Sepharose 4B ativada foram hidratados com 15 ml de HCl 1mM durante 10 minutos. Após a hidratação, o HCl foi retirado da resina utilizando funil de placa porosa evitando o ressecamento da mesma. A resina foi ressuspensa em solução de

bicarbonato de sódio contendo 5ml de anticorpo (fração de IgG purificada) por grama de resina para a adsorção dos anticorpos a matriz. Essa resina com a fração de IgG ficou sob agitação durante 2 horas a temperatura ambiente e posteriormente durante 16 horas a 4°C. Após esse período de incubação, a solução foi filtrada e a resina lavada com NaHCO₃ 0,1M e NaCl 0,5M , pH 8. À essa resina com IgG acoplada foi adicionada etalonamina e a resina ficou sob agitação durante 2 horas. A resina foi lavada após esse período com acetato de sódio 0,1M e NaCl 0,5M, pH 4 e equilibrada com Tris-HCl 0,1M, pH 8.

Após equilíbrio da resina com Tris-HCl 0,1M pH 8, o S1 centrifugado a 18514 xg durante 10 minutos a 4°C foi aplicado a resina com fluxo de 1ml/minuto, lavada a resina para remoção de proteínas fracamente ligadas a resina com Tris 0,1M e 0,15 M NaCl pH 8 e eluída as amostras adsorvidas aos anticorpos com KCl 0,5M, pH 2. As amostras foram neutralizadas com Tris 1M pH8,0.

6.5 Caracterização Proteica

6.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As amostras referentes à expressão, solubilização e frações das cromatografias necessárias para o isolamento da proteína ATN foram submetidas a eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo especificações do método descrito por Laemmli (1970).

O gel de empilhamento foi preparado com 5% de acrilamida e o gel de resolução foi preparado com 12,5% e 15% de acrilamida. Assim como a matriz de poliacrilamida possuía SDS, o tampão da amostra continha Tris 125mM pH 6,8; SDS 4%; azul de bromofenol 0,025%; glicerol 20% e o agente redutor β-mercaptoetanol 0,1 M.

Para a coloração e detecção das proteínas das amostras, o corante utilizado foi o Coomassie Brilliant Blue R-250 e a massa molecular determinada através da comparação com padrão de proteína com massas moleculares conhecidas preparado em nosso laboratório ou de empresas reconhecidas.

6.5.2 Imunoblotting

A expressão da ATN foi monitorada pelo ensaio de imunodeteção através de *Western Blotting* com anticorpos anti-DisBa-01 (1:8000) produzido em camundongos e em coelho.

As amostras foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE 12,5% e, em seguida, transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Sigma-Aldrich), através do sistema de transferência semi-seca (*TransBlot SemiDry*) (BioRad), usando tampão de transferência Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20%, pH 9,0 durante 30 minutos a 15 Volts. Para confirmar a eficiência da transferência, o gel de poliacrilamida foi corado com 0,25% de *Comassie Blue* R-250 (Sigma) dissolvido em 50% de isopropanol e 10% de ácido acético e a membrana de nitrocelulose corada com Ponceau 0,5% (m/v) em ácido acético 0,1% (v/v). As bandas referentes à proteína de interesse foram marcadas e a membrana descorada com ácido acético 0,1% (v/v) e o gel de poliacrilamida com 10% de ácido acético e 10% de metanol.

Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio (leite desnatado 5%, Tween 20 0,5% em TBS) durante 16 horas a 4°C. Após esse período, a membrana foi lavada com TBS 4 vezes durante 3 minutos e incubada por 2 horas com o anticorpo primário anti-DisBa-01 de camundongo/coelho ou anti-histag (1:5000).

Em seguida, uma nova sequência de lavagens da membrana de nitrocelulose foi realizada e a membrana foi incubada por mais 2 horas com anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina (1:5.000). Passado esse tempo, a membrana novamente foi lavada e a solução contendo o substrato cromogênico, BCIP na presença de NBT foi adicionada a esta membrana. A revelação foi interrompida por lavagem da membrana com água.

6.6 Dosagem de Proteína

A determinação da concentração de proteína foi realizada utilizando o kit colorimétrico *BCA™ Protein Assay Kit* (PIERCE) baseada na reação do ácido bicinrônico

(BCA) para detecção colorimétrica e quantificação de proteína total, mesmo método utilizado para dosagem de proteínas descrito no Capítulo 1.

6.7 Ensaios de Atividade Biológica

6.7.1 Ensaios Celulares

As linhagens celulares utilizadas para os ensaios de atividade biológica da ATN foram as seguintes: Linhagens Tumorais: K562 (eritroleucemia humana); B16F10 (melanoma murino) e MDA-MB-231 (câncer de mama independente de estrógeno), Linhagem Controle: fibroblasto de gengiva humana (FGH).

As células FGH e MDA-MB-231 foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Media) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), L-glutamina (2mM), HEPES (15 mM HEPES), penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e fungizona (5 µg/ml) e as células K562 e B16F10 foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Vitrocel) suplementado com 10% de FBS. Todas as culturas foram mantidas a 37°C em estufa de CO₂ 5% (Cellstar).

6.7.2 Inibição da Adesão Celular

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com fibronectina (Sigma), proteína da matriz extracelular e ligante da integrina $\alpha\beta_3$, (1µg/100µl de tampão de adesão (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, MgSO₄ 5 mM, KCl 5 mM, MnCl 1 mM, pH 7,35) e incubadas a 4°C durante a noite. Após a incubação, a placa foi mantida a temperatura ambiente durante 30 minutos e o excesso de proteína de matriz não polimerizada foi retirada dos poços e esses foram bloqueados com solução de BSA 1% (200µl/poço, temperatura ambiente) fresca durante 2 horas visando impedir a ocorrência de falhas na cobertura de fibronectina onde o plástico (passível de adesão celular) fica exposto.

Paralelamente, as células cultivadas conforme descrito anteriormente foram lavadas com tampão de adesão pH 7,35. Imediatamente após a contagem celular utilizando câmara de Newbauer, as células foram ressuspensas para uma concentração de $1 \times 10^5/50 \mu\text{l}$,

marcadas com 12,5 μ M CMFDA na concentração de 1mL para cada 5×10^6 células e incubadas durante 30 minutos a 37°C no banho maria. Nesse momento, as células marcadas foram lavadas com tampão de adesão para a retirada do excesso do marcador, recontadas e reajustadas para a concentração de 1×10^5 células/50 μ l. Após a marcação, as suspensões celulares na presença (1;10;100;1000;2000 nM) ou ausência de ATN foram incubadas a 37°C durante 30 minutos. Finalizado o tempo de incubação, a solução de BSA foi removida das placas de 96 poços e 100 μ l da suspensão celular foi adicionada a cada poço. Para cada concentração analisada foram realizadas triplicatas. A placa foi incubada durante 1 hora (37°C), tempo após o qual os poços foram lavados com tampão de adesão (2-3 vezes de 200 μ l cada). As células aderidas foram lisadas com Triton X-100 0,5% durante 20 minutos a temperatura ambiente e protegidas da luz. Após esse período de tempo de lise celular, a placa foi lida com um comprimento de onda de excitação de 485 nm, emissão de 538 nm e um *cut off* de 530 nm em um fluorímetro de placa (Molecular Devices).

6.7.3 Promoção da Adesão Celular

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com diferentes quantidades da proteína dissolvida em tampão de adesão e deixadas 16 horas abertas a 4°C. No dia seguinte, os poços foram bloqueados com BSA 1% durante 2 horas. Após esse tempo, os poços foram lavados 3 vezes com PBS. Ao mesmo tempo, as células na concentração de 1×10^5 células/50 μ l foram marcadas com CMFDA durante 30 minutos a 37°C. Após esse tempo, as células foram depositadas nos poços e deixadas durante 1 hora para verificação da adesão das células nas proteínas imobilizadas. Seguindo o tempo de adesão, os poços foram lavados 3 vezes com PBS e lisadas com Triton X-100 0,5% durante 20 minutos a temperatura ambiente protegido da luz. Após, a placa foi lida em um comprimento de onda de excitação de 485 nm, emissão de 538 nm e um *cut off* de 530 nm (Molecular Devices).

6.7.4 Desadesão Celular

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 1 μ g/100 μ l de fibronectina dissolvidas em tampão de adesão e deixadas overnight a 4° C. No dia seguinte, os poços

foram bloqueados com BSA 1% durante 2 horas. Após esse tempo, os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1X. Ao mesmo tempo, as células na concentração de 1×10^5 células/50 μ l foram marcadas com CMFDA durante 30 minutos a 37°C. Após esse tempo de marcação, as células foram depositadas nos poços e deixadas durante 2 horas para a promoção da adesão dessas células à fibronectina. Após o tempo de adesão celular, diferentes concentrações da proteína (1-1000 nM) foram adicionadas aos poços e deixadas em incubação durante 30 minutos. Passado esse tempo, os poços foram lavados 3 vezes com PBS e lisadas e lidas como descrito acima.

6.7.5 Proliferação Celular

Para o ensaio de proliferação celular, 5×10^3 células foram semeadas em cada poço de uma placa de 96 poços com meio de cultivo adequado com 10% SFB. Passadas 4 horas de incubação a 37°C em estufa umidificada a 5% CO₂ para permitir a adesão das células ao fundo da placa, foi adicionado o tratamento com a desintegrina em diferentes concentrações (1-1000 nM) reduzindo para 5% de SFB em cada tratamento. Após os tempos de incubação de 24 e 48 horas com a ATN, as células foram fixadas com etanol 70% durante 10 minutos, lavadas com PBS e coradas com cristal violeta 0,5% por 30 minutos. Decorrido esse tempo, os poços foram lavados até a eliminação do excesso de corante, as células lisadas com SDS 1% por 30 minutos e realizada a leitura a 540 nm.

6.7.6 Avaliação da apoptose por eletroforese de DNA

Apoptose é uma forma extremamente regulada de morte celular e a fragmentação do DNA é um marcador bioquímico desta morte celular. Para avaliar se a proteína de estudo induz a apoptose, $1,5 \times 10^6$ células foram sedimentadas em cada poço da placa de 96 poços. Após 4 horas de adesão aos poços, as células foram tratadas com ATN em diversas concentrações (10;100;1000 nM) e mantidas sob esse tratamento por 48 horas em estufa umidificada a 37°C e 5%CO₂. Após esse período de incubação as células foram descoladas com solução de tripsina 1%, centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos e o precipitado ressuspendido, lisado com Triton X-100 0,1%, Tris 5mM e EDTA 20mM pH 8 e mantido a 4°C durante 30 minutos. Em seguida, foi adicionada RNase (20mg/ml) e a mistura

foi incubada durante 1 hora a 37°C. Após essa incubação, outra, agora a 65°C foi realizada com proteinase K (250mg/ml). Para cada volume de lisado celular foi adicionado 1 volume de fenol:clorofórmio. A mistura foi agitada e centrifugada durante 5 minutos a 12857 x g. A fase superior foi transferida para novo microtúbulo e foi adicionado acetato de sódio 3M e etanol absoluto gelado mantendo-se a -20°C durante 16 horas. Após esse período, o material foi centrifugado a 12857 x g por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado seco em estufa a 37°C e posteriormente ressuspensão em tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). O DNA extraído das células por esse processo foi resolvido em gel de agarose 1% com brometo de etídio para verificar a fragmentação do DNA celular em caso de apoptose celular.

6.7.7 Análise de Receptores Celulares por Citometria de Fluxo

As linhagens celulares passaram por análise de padrão de expressão de integrinas através de citometria de fluxo indireta. Para tal ensaio, 1×10^6 células foram incubadas em gelo com 1µg de anticorpo primário para diferentes integrinas por um período de 40 minutos (anti- $\alpha 2$, anti- $\alpha 4$, anti- $\alpha 5$, anti- $\alpha 6$, anti- αv , anti- $\alpha v \beta 3$, anti- $\alpha v \beta 5$, anti- $\beta 1$, anti- $\beta 4$, Santa Cruz). Após o período de incubação, as células passaram por lavagem com PBS, centrifugadas a 1300 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas por mais 40 minutos em gelo protegido da luz com 0,5µg de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com FITC (Santa Cruz). Decorrido esse tempo, as células foram novamente centrifugadas com PBS a 1200 rpm por 10 minutos, ressuspensas em 500 µl de PBS e feita a leitura no citômetro FACScalibur (BD Bioscience). As integrinas expressas por cada linhagem celular apresentaram fluorescência diferente da fluorescência natural das células podendo ser quantificadas pelo citômetro.

6.7.8 Competição de Anticorpos

Utilizando o mesmo procedimento de análise dos receptores acima descrito, a ATN em diferentes concentrações foi adicionada 30 minutos antes da primeira incubação com os anticorpos primários positivos para cada linhagem celular para verificar um possível

bloqueio do sítio de ligação dos anticorpos primários, competindo pela ligação aos receptores. Em seguida, seguiu-se ao método descrito acima.

6.7.9 Zimografia

Essa técnica tem o objetivo de determinar a atividade de gelatinases das metaloproteases (MMP-2 e 9). As MMP basais expressas pelas linhagens FGH, B16F10 e MDA-MB-231 estimuladas ou não com ATN foram analisadas através de zimografia de gelatina. Em placa de petri de 2 cm², 4x10⁵-1x10⁶ células foram plaqueadas com meio de cultivo adequado a cada linhagem e suplementado com 10% de SBF até que as células atingissem 100% de confluência em estufa umedecida com 5% de CO₂. Neste momento, o meio de cultivo foi trocado por meio de cultivo fresco sem SBF durante 24 horas. Após esse período, as células foram estimuladas com ATN em diferentes concentrações durante 24 horas. O meio condicionado foi então aspirado, centrifugado a 12857 x g durante 5 minutos a 4°C para a remoção dos restos celulares e o sobrenadante armazenado a -20°C. Dez µg de proteínas totais do sobrenadante de cada tratamento incubados com tampão de amostra sem β-mercaptoetanol foram utilizados como amostras em géis de poliacrilamida 10% com 0,1% de gelatina, sendo a eletroforese realizada a 4°C e 80 Volts constantes durante 3 horas. Após resolução das amostras em gel de poliacrilamida com gelatina, o gel foi lavado 2X com Triton X-100 2.5% durante 30 minutos cada lavagem e incubado durante 16-20 horas a 37°C com 50 mM Tris pH 8.0, 5 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃ e 10mM ZnCl₂. Passado o período de incubação, o gel de poliacrilamida foi corado com Comassie Blue R-250 e descorado com ácido acético: metanol: água para a visualização de bandas claras de atividade das gelatinases. Foram realizados três experimentos independentes. A intensidade das bandas foi mensurada através do software Image Pro Plus.

6.7.10 Indução da polimerização do citoesqueleto de actina

Este experimento foi realizado no laboratório do Dr. Francis Markland sob orientação dos pesquisadores Steven Swenson e Radu Minea como parte do plano de trabalho elaborado para realização do estágio no exterior.

Lâminas de 4 poços para cultura (4-well CultureSlide, BD Falcon) foram sensibilizadas durante 16 horas com matrigel completo na proporção 1:50 com meio de cultura. Após esse período, o matrigel não polimerizado foi aspirado e uma suspensão celular de 3×10^4 células /500 μ l foi adicionada a cada poço com meio de cultivo com 10% de SFB. Passadas 24 horas de incubação em estufa a 37°C e 5%CO₂ para a adesão das células ao substrato, as células foram tratadas com PBS para o controle negativo, citocalasina D (Calbiochem) como controle positivo e com a ATN na concentração de 1000 nM. Um procedimento alternativo foi feito incubando-se as células em suspensão com a ATN e posteriormente sedimentadas aos poços. Em seguida, o meio de cultivo foi aspirado, as células fixadas com acetona gelada durante 5 minutos e posteriormente lavadas com PBS.

Para visualização do citoesqueleto de actina, foi adicionado por 20 minutos faloidina na proporção de 1:40 protegida da luz e, posteriormente as células foram lavadas com PBS e adicionado o fluoróforo Hoescht na proporção 1:100 para identificação do núcleo celular. Em seguida, as células foram lavadas, e foi adicionado meio para microscopia de fluorescência (Kirkegaard & Perry Laboratories) para selar a lamínula sobre a lâmina de 4 poços. As células foram visualizadas em microscópio óptico e confocal.

6.7.11 Ensaio de Invasão Celular

Este experimento foi realizado no laboratório do Dr. Francis Markland sob orientação do pesquisador Steve Swenson.

Os insertos com coating de matrigel foram mantidos em estufa umidificada a 37°C com 5% CO₂ com meio de cultivo contendo 10% SFB na face inferior e superior da câmara de Boyden por 4 horas. Em seguida, o meio do compartimento inferior da câmara de Boyden foi trocado por meio DMEM com 0 ou 10 % SFB. Na face superior, foram semeadas 1×10^5 células tumorais tratadas ou não com a desintegrina. Após 16 horas, as células tumorais que permaneceram na face superior da câmara, foram retiradas com o auxílio de um cotonete e, as células na face inferior foram fixadas com 100% de metanol e as células na face inferior da membrana do inserto coradas com azul de toluidina. Fotos em campos aleatórios em cada filtro foram obtidos com o auxílio de câmara acoplada ao microscópio e as células foram contadas com auxílio do software Image J.

6.7.12 Ensaio de migração celular por Wound Healing

Este experimento foi realizado no laboratório do Dr. Francis Markland sob orientação do pesquisador Steve Swenson.

Placas de 6 poços (Costar) foram sensibilizadas com matrigel completo (BD) na proporção 1:50 em meio DMEM durante 16 horas a 37°C. Em seguida, o matrigel não polimerizado foi aspirado e 1×10^6 células foram sedimentadas, permitindo o estabelecimento de 100% de confluência celular na presença de DMEM com 10% de SFB. Após esse período, uma fissura na monocamada celular foi realizada com o auxílio de uma ponteira de 200µl. Os poços foram lavados com meio DMEM sem soro para eliminar as células que estavam soltas e foi adicionado meio DMEM sem SFB e o tratamento com a ATN. Após 24 horas em estufa a 37°C foi analisado o fechamento da fissura na monocamada celular. Foram tiradas 5 fotos de cada tratamento no tempo zero e no mesmo local no tempo de 24 horas para determinação da % de fechamento da fissura.

6.8 Análise Estatística

Os experimentos celulares foram realizados pelo menos três vezes e em triplicata para a obtenção de um n amostral significativo para a realização das análises de média e erro padrão, e deste modo podendo ser aplicados os testes estatísticos pertinentes às variâncias (ANOVA 1 Way) considerando-se aceitáveis os valores de $p < 0,05$ e os resultados validados pelo teste Dunnett pelo programa computacional Prism Instat (Graphpad Instat v.3, GraphPadSoftware, San Diego, CA, USA).

7. Resultados

7.1 Subclonagem da ATN

A amplificação da sequência codante da desintegrina DisBa-01 de *Bothrops alternatus* foi realizada utilizando como molde o plasmídeo pDisBa obtendo um produto de amplificação de aproximadamente 236 pb referente ao tamanho esperado (figura 20).

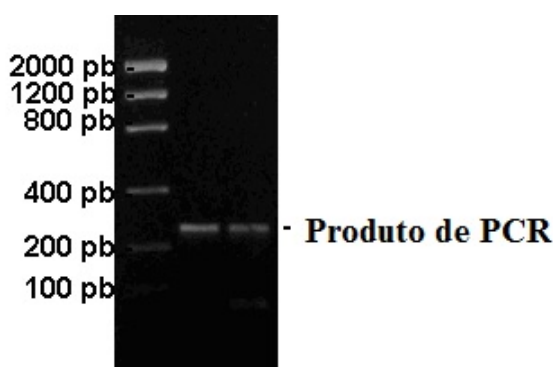


Figura 20. Amplificação da sequência codante da desintegrina de *Bothrops alternatus*. Eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio para analisar a amplificação por PCR da desintegrina de *Bothrops alternatus*. M: 5µl de Low DNA Mass Ladder; 1-2: produto de amplificação de 236pb.

O produto da amplificação passou pelo tratamento com enzimas de restrição *Nco* I e *Eco* RI para obtenção de extremidades coesivas semelhantes às extremidades obtidas na modificação do vetor pET28a para exclusão da sequência destinada a produção de uma cauda de histidinas em fusão N-terminal com a proteína de estudo. Após a ligação do inserto com o vetor modificado, análise de restrição com as mesmas enzimas usadas na clonagem foi realizada para a verificação da inserção correta no vetor e confirmação da subclonagem (figura 21).

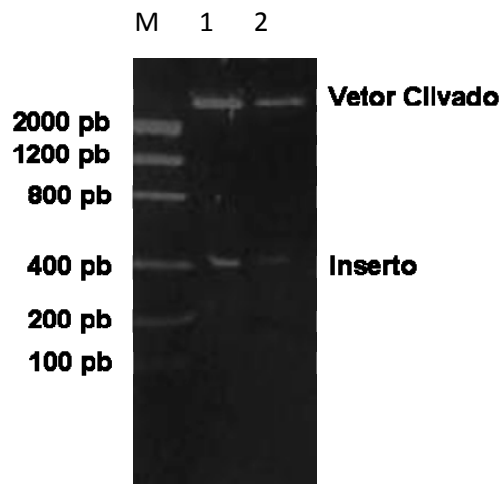


Figura 21. Análise de Restrição do plasmídeo pATN. Eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio para análise da digestão do plasmídeo pATN com as enzimas de restrição *NcoI* e *EcoRI*. Duas bandas, vetor pET-28a clivado de aproximadamente 5000 pb e inserto de 236 pb. M: 5µl de Low DNA Mass Ladder; 1-2: análise de restrição do pATN.

Na figura 21 verificamos a presença de dois produtos de restrição, um referente ao tamanho esperado do DNA que codifica a desintegrina e o outro referente ao plasmídeo clivado.

7.2 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento do novo plasmídeo pATN foi realizado com os oligonucleotídeos específicos DisBaFN e DisBam além do oligonucleotídeo promotor T7 para confirmação da subclonagem da desintegrina e confirmação da inserção da sequência no vetor pET28a modificado pelas enzimas *NcoI* e *EcoRI*. As seqüências de alta qualidade que apresentaram no mínimo 94% de identidade com a seqüência da desintegrina de *Bothrops alternatus* depositada no genbank (AY 259516) foram as utilizadas para identificarmos as colônias de bactérias que expressavam a proteína mais semelhante à DisBa-01, sendo escolhida a colônia 2 por apresentar alto grau de identidade (~95 %) com a DisBa-01 (figura 23 e 24).


```

AY259516.1 -----
Col2.Seq.1 -----
Col2.Seq.3 AATGAACTTTTGGAGGCGGGAGAAGAATGTGACTGTGGCACTCCTGAAAATCCGTGCTGC 60

AY259516.1 -----CCTGTAAACTGAGACCAGGGGCGCAGTGTGCAGAAGGACTGTGTTGTGAC 50
Col2.Seq.1 -----CCTGTAAACTGAGACCAGGGGCGCAGTGTGCAGAAGGACTGTGTTGTGAC 50
Col2.Seq.3 GATGCTGCAACCTGTAAACTGAGACCAGGGGCGCAGTGTGCAGAAGGACTGTGTTGTGAC 120
*****

AY259516.1 CAGTGCAGATTTATGAAAGAAGGAACAGTATGCCGGA-TTGCA-AGGGGTGATGACATGG 108
Col2.Seq.1 CAGTGCAGATTTATGAAAGAAGGAACAGTATGCCGGA-TTGCA-AGGGGTGATGACATGG 108
Col2.Seq.3 CAGTGCAGATTTATGAAAGAAGGAACAGTATGCCGGA-TTGCA-AGGGGTGATGACATGG 180
*****

AY259516.1 ATGATTACTGCAATGGCATATCTGCTGGCTGTCCCAGAAATCCCTTCCATGCCTAA 164
Col2.Seq.1 ATGATTACTGCAATGGCATATCTGCTGGCTGTCCCAGAAATCCCTTCCATGCCTAA 164
Col2.Seq.3 ATGATTACTGCAATG-CATATCTGCTG-CTGTCCCAGAAANN-----GCC--- 224
*****

```

Figura 23. Alinhamento de nucleotídeos da DisBa-01 e clone 2 da ATN. As sequências de nucleotídeos obtidas pelo sequenciamento do plasmídeo pATN contido nas células bacterianas da colônia 2 foram alinhadas à sequência de nucleotídeo da DisBa-01 depositada no banco de dados mundial utilizando o programa ClustalW. Este alinhamento mostra alto grau de identidade (95%) entre as sequências de nucleotídeos, o que pode resultar em uma não alteração de aminoácidos na desintegrina ATN. Sequência 1: sequenciamento com *primer forward* ; Sequência 3: sequenciamento com *primer T7*. * significa identidade entre os nucleotídeos.

```

pATNp AGATCTCGATCCCGGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAA 60
COL2 -----

pATNp TTCCCTCTAGAAATAATTTTGTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGAAATGAA 120
COL2 -----AATGAA 6
*****

pATNp CTTTGGAGGCGGGAGAAGAATGTGACTGTGGCACTCCTGAAAATCCGTGCTGCGATGCT 180
COL2 CTTTGGAGGCGGGAGAAGAATGTGACTGTGGCACTCCTGAAAATCCGTGCTGCGATGCT 66
*****

pATNp GCAACCTGTAAACTGAGACCAGGGGCGCAGTGTGCAGAAGGACTGTGTTGTGACCAGTGC 240
COL2 GCAACCTGTAAACTGAGACCAGGGGCGCAGTGTGCAGAAGGACTGTGTTGTGACCAGTGC 126
*****

pATNp AGATTTATGAAAGAAGGAACAGTATGCCGGAATGCAAGGGGTGATGACATGGATGATTAC 300
COL2 AGATTTATGAAAGAAGGAACAGTATGCCGGAATGCAAGGGGTGATGACATGGATGATTAC 186
*****

pATNp TGCAATGGCATATCTGCTGGCTGTCCCAGAAATCCCTTCCATGCCTAAGAATTGCGAGCTC 360
COL2 TGCAATGGCATATCTGCTGGCTGTCCCAGAAATCCCTTCCATGCCTAA----- 234
*****

pATNp CGTCGACAAGCTTGGCGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGC 420
COL2 -----

```

Figura 24. Alinhamento do plasmídeo pATN e a sequência de nucleotídeo obtida do plasmídeo da colônia 2 de E.coli (DH5- α). * identidade entre os nucleotídeos.

No alinhamento da figura 25 encontra-se a sequência traduzida da *DisBa-01* que apresenta o peptídeo de fusão com 6 histidinas (112 aminoácidos), a sequência traduzida da nova construção ATN (domínio desintegrina) e a sequência traduzida da desintegrina depositada no genbank. Na nova construção o peptídeo de fusão de 34 aminoácidos não está presente e também não apresenta alterações na estrutura primária da proteína e a manutenção do seu sítio ativo RGD na porção C-terminal da sequência da proteína. O alinhamento evidencia a ausência do peptídeo de fusão na ATN e a presença na *DisBa-01* com a fase aberta de leitura codificando os 77 aminoácidos do domínio desintegrina.

AY259516.1	-----NELLEAGEECDGTPGNPCCDAATC	25
ATN	-----NELLEAGEECDGTPGNPCCDAATC	25
<i>DisBa-01</i>	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSGNELLEAGEECDGTPGNPCCDAATC	60

AY259516.1	KLRPGAQCAEGLCCDQCRFMKEGTVCRIRGDDMDDYCNGISAGCPRNPFHA	77
ATN	KLRPGAQCAEGLCCDQCRFMKEGTVCRIRGDDMDDYCNGISAGCPRNPFHA	77
<i>DisBa-01</i>	KLRPGAQCAEGLCCDQCRFMKEGTVCRIRGDDMDDYCNGISAGCPRNPFHA	112

Figura 25. Alinhamento das sequências de aminoácidos da *DisBa-01*, ATN e sequência depositada no GeneBank. *identidade entre os aminoácidos.

7.3 Expressão e Solubilidade

O plasmídeo pATN foi utilizado na transformação das cepas de *Escherichia coli* BL21(DE3) e ensaios de expressão e solubilidade foram realizados para constatar a presença de banda protéica de aproximadamente 10 kDa. A proteína pode ser recuperada do extrato celular sem a necessidade de ser desnaturada, o que representou uma vantagem em relação ao método de produção da *DisBa-01* (figura 26 A).

O ensaio de expressão e solubilidade foi submetido à outra caracterização bioquímica além da análise do padrão protéico em gel de poliacrilamida, o imunoblotting que foi realizado utilizando os anticorpos policlonais anti-*DisBa-01* produzidos em coelho (figura 26 B). Esta molécula manteve a reatividade com anticorpos anti-*DisBa-01* demonstrando a

manutenção da exposição do sítio adesivo RGD para interação com outras moléculas o que é importante na determinação da atividade desta molécula.

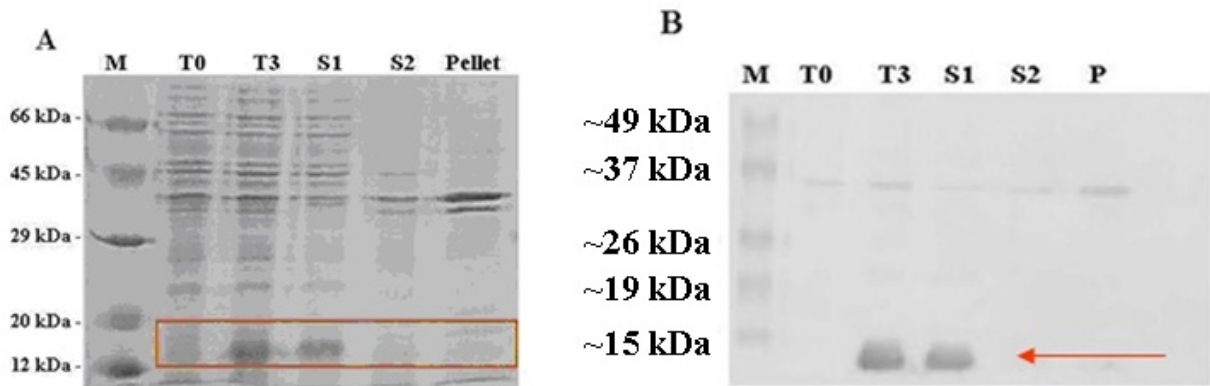


Figura 26: Expressão Heteróloga e Solubilidade da ATN e Western Blotting. A: SDS-PAGE 15% do extrato celular de uma cultura de *E.coli* BL21(DE3)pATN induzida com 1mM IPTG. M: Marcador de Massa Molecular; T0: extrato celular no tempo zero de indução; T3: tempo de 3 horas de indução; S1: sobrenadante não desnaturante; S2: sobrenadante desnaturante com 6M Uréia; Pellet: precipitado. As bandas marcadas com o retângulo vermelho representam a proteína de interesse. B: **Imunoblotting anti-DisBa**. As mesmas amostras foram submetidas à reação com anticorpo anti-DisBa-01. A seta indica o reconhecimento da banda da expressão da ATN pelo anticorpo anti-DisBa-01.

7.4 Produção, Titulação e Purificação dos Anticorpos anti-DisBa-01 Policlonais de coelhos

O antígeno DisBa-01 foi eficiente na imunização do coelho sendo o sistema imune deste capaz de produzir anticorpos específicos contra essa proteína. A fração de IgG dos anticorpos anti-DisBa-01 foi purificada através da coluna de afinidade por proteína A e titulada pelo método ELISA (Ensaio de Imuno-absorção por ligação enzimática) apresentando um título para um anticorpo policlonal de 1:32 000 (figura 27) contra desintegrinas RGD e uma alta especificidade para a DisBa-01 e outras desintegrinas RGD, além de baixa reatividade cruzada, e foi então empregado na técnica de western blotting, como visto nas figura 26 B e 29 C .

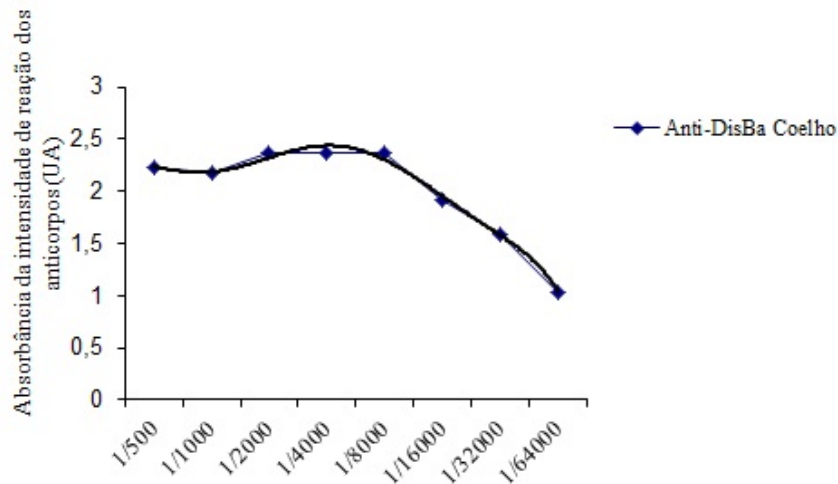


Figura 27. Curva de Titulação de Anticorpos anti-DisBa-01. O título foi determinado pelo método de ELISA diluindo a fração de IgG de coelho e feita a leitura em leitor de placa Dynex (540 nm). A curva cheia representa o perfil da titulação do anticorpo anti-DisBa-01. A regressão logarítmica foi realizada para a determinação do título com confiabilidade de 0,99 como sendo 1:32 000 que indica a maior diluição dos anticorpos que apresenta reatividade com o antígeno.

Após verificação da alta reatividade da fração de IgG com a desintegrina ATN (figura 26), essas imunoglobulinas foram imobilizadas em resina para montagem de uma coluna de afinidade específica para esse tipo de proteína. No entanto, a eficiência na adsorção das imunoglobulinas à resina não foi a esperada inviabilizando a purificação da desintegrina presente no S1 por este método (figura 28).

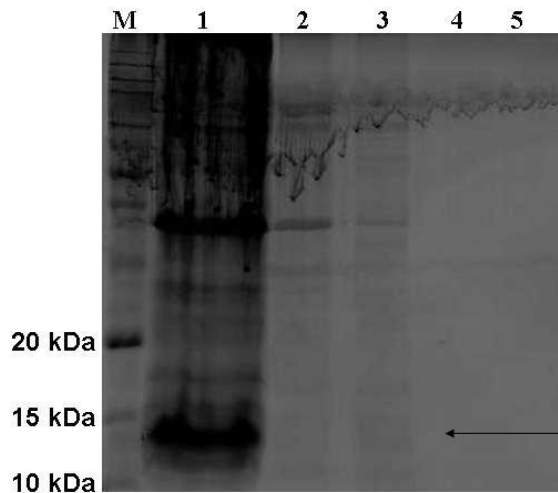


Figura 28. Gel de eletroforese representando os resultados obtidos pela cromatografia de afinidade a anticorpo. A ATN solúvel presente no sobrenadante não apresentou capacidade de ligação aos anticorpos imobilizados a resina, ficando retido na fração 1 referente as amostras não ligadas e na fração 3 referente as amostras fracamente adsorvida a resina . Tampão de eluição com Tris-HCl 0,1M e NaCl 0,15M pH 8. Frações 4 e 5, são as amostras adsorvidas aos anticorpos eluídas com KCl 0,1M pH 2. Não foi verificada presença protéica nestas frações.

7.5 Purificação da proteína ATN

A desintegrina ATN obtida por meio de sistema de bacteriano foi purificada através de uma serie de cromatografias. A primeira delas em coluna de exclusão molecular Superdex 200 HiLoad 16/60 utilizando o tampão Tris 10mM e 0,15 M de NaCl pH 8,6. A figura 29 A representa o perfil cromatográfico e figura 29 B o perfil eletroforético da primeira etapa de purificação.

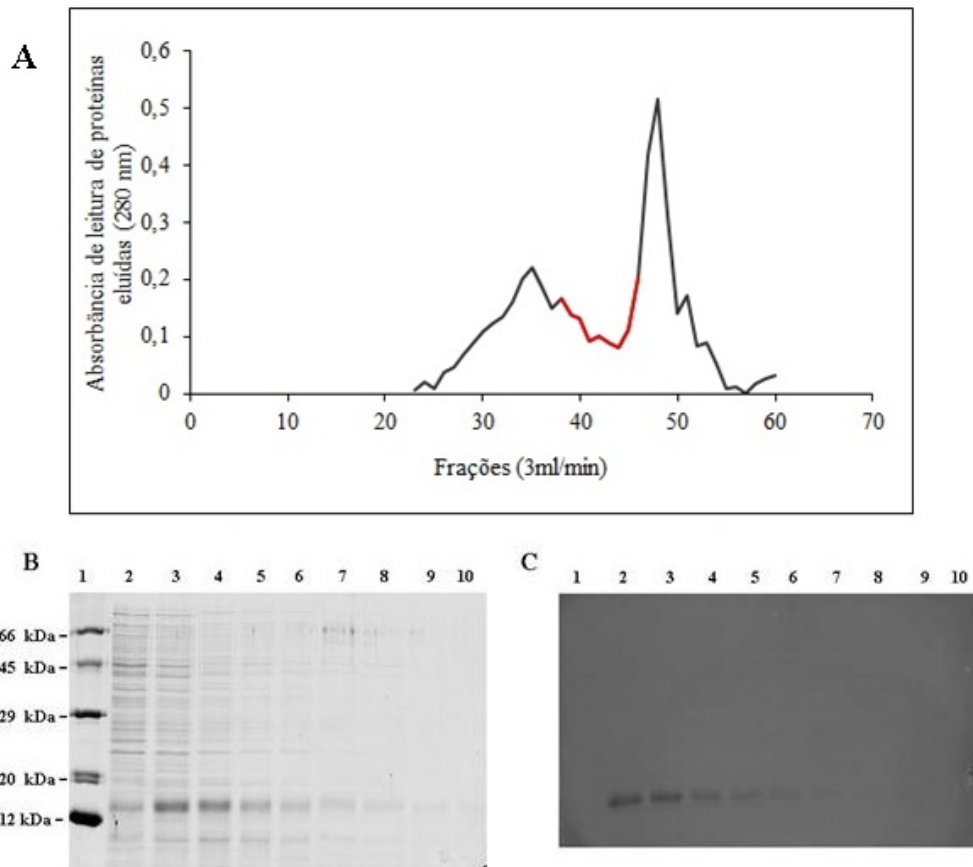


Figura 29. Primeira Etapa de Purificação_Superdex 200. O lisado bacteriano foi submetido (S) a uma primeira fase de purificação utilizando uma coluna de exclusão molecular. A) Perfil cromatográfico, leitura a 280 nm. Curva em vermelho referente as frações eluídas contendo a ATN. B) Perfil eletroforético. 2-10: frações eluídas referentes as frações 38-46. C) *Western Blotting* com anti-DisBa-01 de camundongo 1:8000 identificando as frações a serem separadas e reunidas para o outro processo de purificação para isolamento da proteína ATN.

Uma vez que a desintegrina ATN não apresenta na sua estrutura primária muitos aminoácidos aromáticos, a sua detecção a 280 nm fica restrita à regiões localizadas entre picos protéicos. As frações eluídas contendo a desintegrina ATN foram reunidas e concentradas para a segunda etapa de purificação (perfil cromatográfico, dados não mostrados). A coluna Superdex 75 foi usada nessa etapa utilizando o mesmo princípio cromatográfico, entretanto com um fator de exclusão molecular menor para o refinamento da purificação da proteína (figura 30).

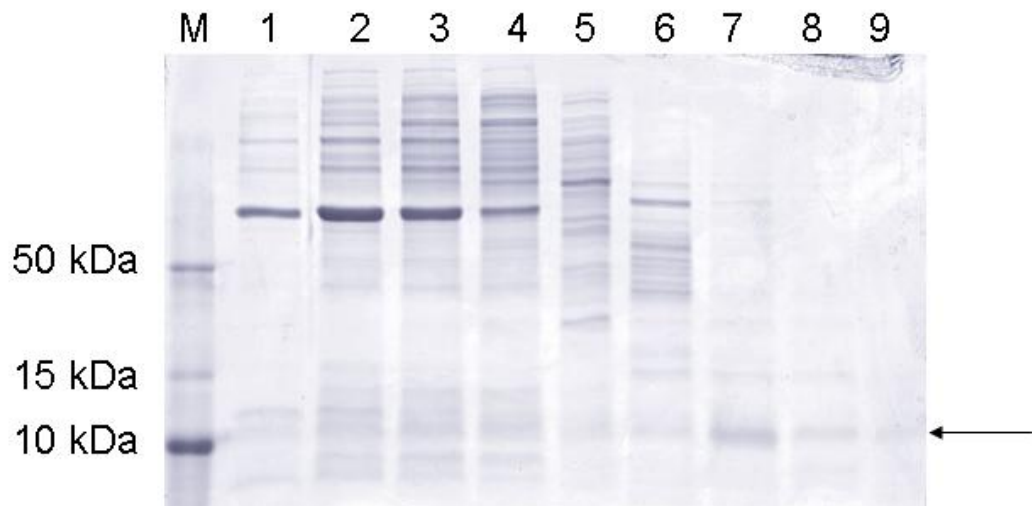


Figura 30. Segunda Etapa de Purificação_Superdex 75. Perfil eletroforético. M: Marcador: *benchmark protein ladder* (5 μ l); 1-9: Amostras das frações eluídas (20 μ l).

As amostras contendo a desintegrina na presença de outras proteínas (frações 7-9) ainda passaram por outro tipo de cromatografia, a de troca de iônica em coluna aniônica MonoQ 5/50Gl e as frações eluídas com 30% de NaCl 1M (segundo degrau do gradiente de eluição) onde a ATN foi isolada (A10-A12), foram reunidas e dialisadas em Centricon 30 000 (figura 31).

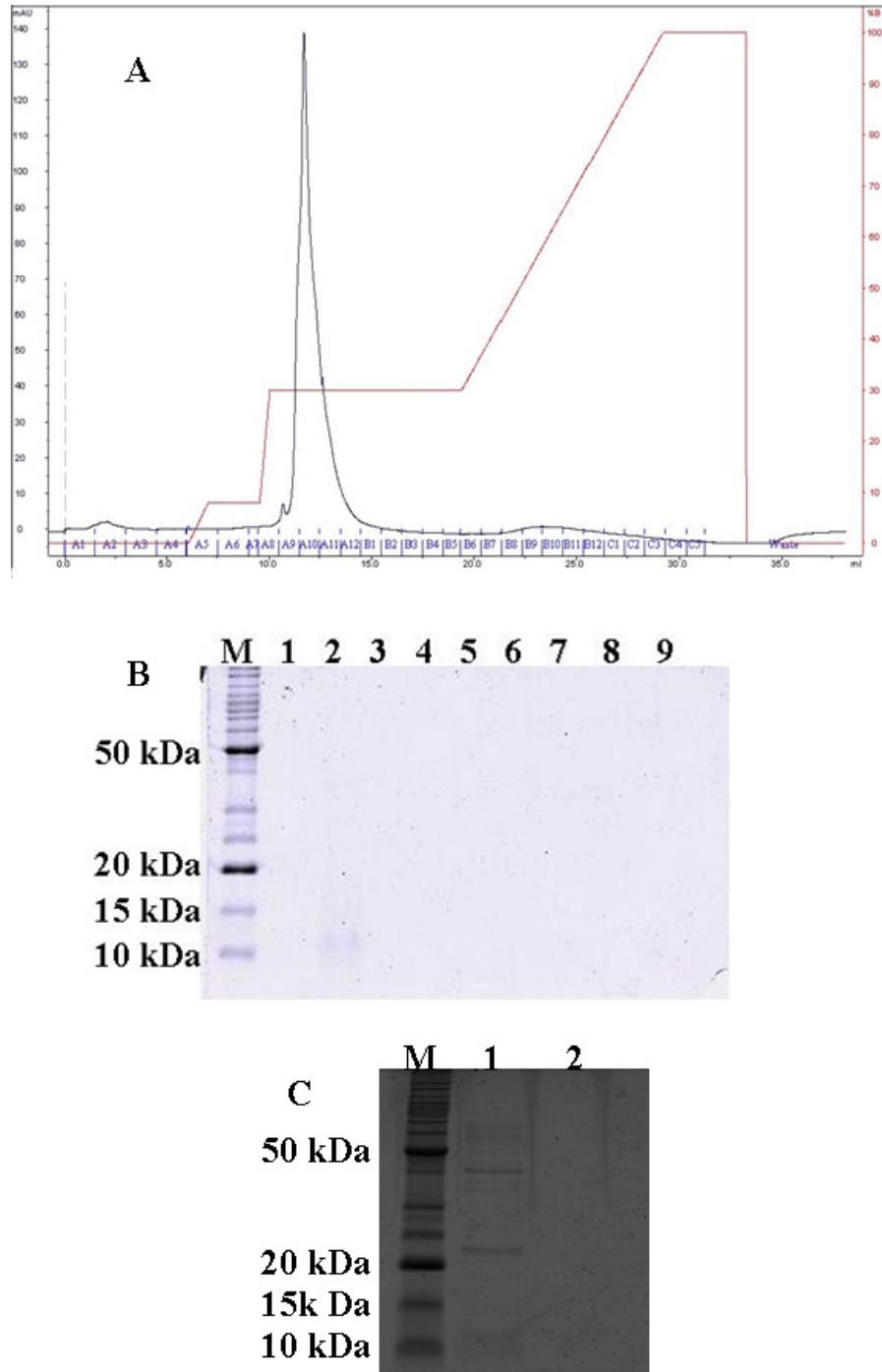


Figura 31. Etapa final de purificação_MonoQ 5/50 GL. As frações contendo a ATN foram reunidas, dialisadas e concentradas para etapa de refinamento da purificação da proteína. Gradiente não isocrático, com dois degraus: 10% e 30% de NaCl 1M pH 8.6, proteína eluída no segundo degrau. A: perfil cromatográfico da eluição da ATN, eixo y esquerdo: leitura UV a 280 nm, eixo y direito: % de tampão B; eixo x: frações. B: SDS-PAGE da cromatografia de troca iônica. M: marcador de massa molecular; 1-3: frações referentes ao pico majoritário (A10-A12). C: SDS-PAGE das amostras concentradas e dialisadas em Centricon 30.000. M: marcador de massa molecular, 1-2: amostras pré-coluna Mono; 3: parte superior do Centricon 30.000; 4: ATN pura parte inferior do centricon 30.000. Seta vermelha indica a localização da ATN.

Todas as amostras foram analisadas quanto à sua integridade e pureza por meio do perfil eletroforético nas etapas de purificação e a reatividade com o anticorpo anti-DisBa-01 através de *western blotting*.

Um grau de pureza suficiente na amostra foi obtido com esse procedimento de isolamento da desintegrina (figura 31 B e C) e um rendimento de 0,9 mg/L de expressão heteróloga.

7.6 Determinação de Receptores Celulares

Todas as células utilizadas neste trabalho tiveram os seus receptores celulares analisados por citometria de fluxo indireta com o intuito de delinear o perfil de expressão das integrinas, presentes na membrana celular destas células. Os resultados obtidos para FH e MDA-MB-231 foram publicados juntamente com os resultados para DU-145 (SELISTRE DE ARAUJO *et al.*, 2010) (Figura 32 A).

As integrinas α_v , α_5 e β_1 foram identificadas como as mais expressas nas membranas das K562, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ estão presentes mas em baixas proporções e as demais integrinas testadas não foram identificadas (figura 32 B).

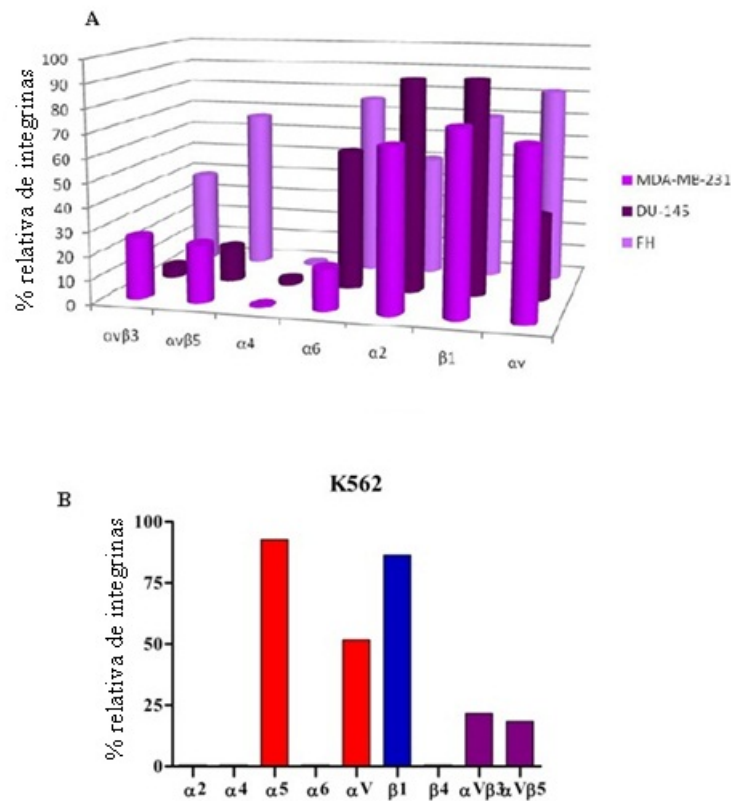


Figura 32. **Análise da Expressão de Integrinas das células Fibroblastos, MDA-MB-231 e K562.** Citometria de fluxo indireta permitiu a detecção do padrão de expressão de moléculas adesivas, integrinas, nas membranas celulares das células de tumorais (MDA-MB-231,DU-145 e K562)e normais (Fibroblasto) (5×10^5 - 1×10^6 células). Os anticorpos anti- αv , anti- $\alpha 5$, anti- $\alpha v\beta 3$,anti- $\alpha v\beta 5$ e anti- $\beta 1$ identificaram a presença das suas respectivas integrinas.

7.7 Promoção da Adesão Celular pela ATN

As desintegrinas podem mimetizar o efeito de uma molécula de adesão celular como as proteínas da MEC para diversas células. Na tentativa de elucidar se essa desintegrina recombinante desempenha esse papel de molécula adesiva para as células de eritroleucemia, a ATN (1; 2,5 e 5 μg) foi utilizada para sensibilizar os poços das placas de 96 poços. Deste modo, na figura 32 podemos ver que a ATN não desempenha um papel de molécula adesiva significativa para as células K562 em nenhuma das massas testadas quando comparadas com

uma das proteínas da MEC, como a fibronectina como controle positivo. A ATN não se comportou como um suporte de adesão para as células K562 comparando com a fibronectina como controle positivo.

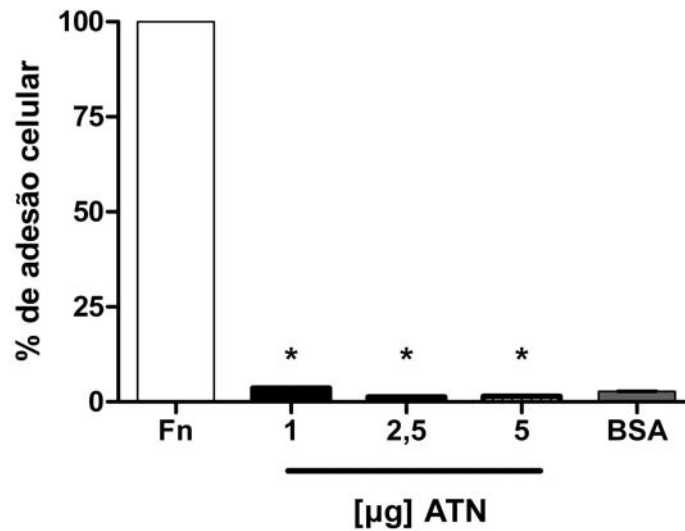


Figura 33: Promoção da Adesão das células K562 a Alternatin. O experimento foi realizado em triplicata e as barras representam erro padrão. * $p < 0,05$, teste de Dunnett.

7.8 Inibição da Adesão Celular

A ATN foi testada para avaliar a capacidade de inibir a adesão celular das diferentes linhagens à fibronectina assim como a DisBa-01 foi capaz de inibir a adesão das B16F10 e HMEC, neste caso à vitronectina (Ramos *et al.*, 2008). O efeito inibitório deste tipo de molécula se manteve eficiente no caso das linhagens tumorais com receptores para seqüência RGD, pois apresentaram sua capacidade de ligação ao substrato reduzida pela presença da desintegrina em todas as concentrações testadas, exceto a linhagem MDA-MB-231 (figura 34 D) que teve sua habilidade de adesão inibida apenas na concentração de 100 nM. No entanto, esta célula não apresenta muitos receptores celulares para a seqüência RGD, sítio de ação para a ATN.

Os fibroblastos, considerado neste trabalho como uma linhagem celular não tumoral, não sofreram efeitos inibitórios desta molécula, exceto em alta concentração, 2000 nM (figura 34 B).

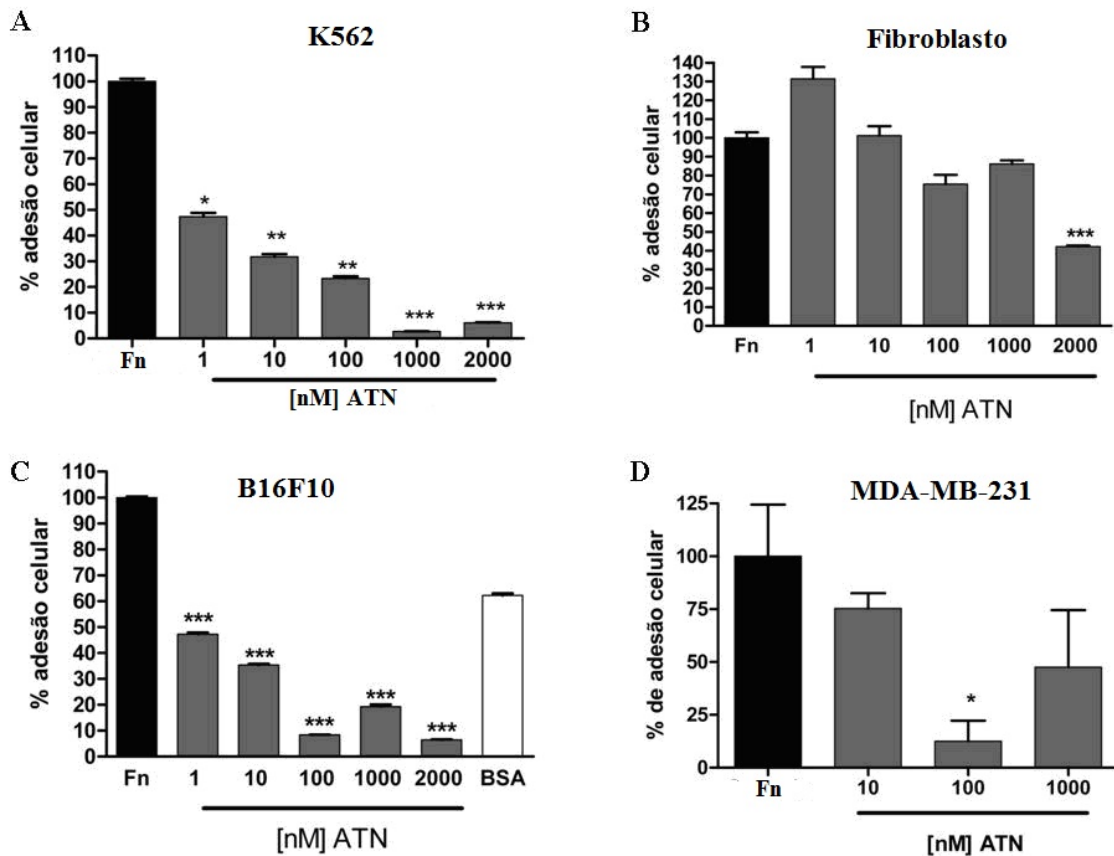


Figura 34. Ensaio de Inibição da Adesão celular à fibronectina. A ATN inibiu a adesão das linhagens celulares à fibronectina (1 μ g/poço) immobilizada nos poços. As células foram incubadas com CMFDA e na presença ou ausência de ATN (controle positivo). A: K562; B: fibroblastos; C: B16F10; D: MDA-MB-231. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam erro padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$, *** $p < 0,001$.

A ATN apresenta a mesma atividade concentração-dependente de inibição da adesão celular da DisBa-01 (IC_{50} 225 nM para B16F10) no entanto, os IC_{50} são menores para K562, B16F10 e fibroblasto respectivamente 0,6646 nM, 0,6315 nM e 1451 nM, ressaltando que esse efeito de inibição da adesão foi verificado na presença de fibronectina e não de vitronectina como foi analisado no estudo de Ramos e colaboradores (2008).

7.9 Desadesão Celular

A capacidade de desaderir uma célula previamente aderida a uma proteína da MEC, como a fibronectina também foi testada para determinar a atividade da desintegrina ATN nos processos adesivos celulares. Neste ensaio, as mesmas concentrações de desintegrinas utilizadas nos outros ensaios adesivos foram testadas. A concentração de 1 nM de ATN promoveu a desadesão das K562, células não aderentes e das células de melanoma murino. Nessas células aderentes, as outras concentrações da desintegrina também foram capazes de desaderir as células que estavam aderidas a fibronectina. No entanto, os fibroblastos mantiveram-se aderidos a proteína de matriz em todas as concentrações.

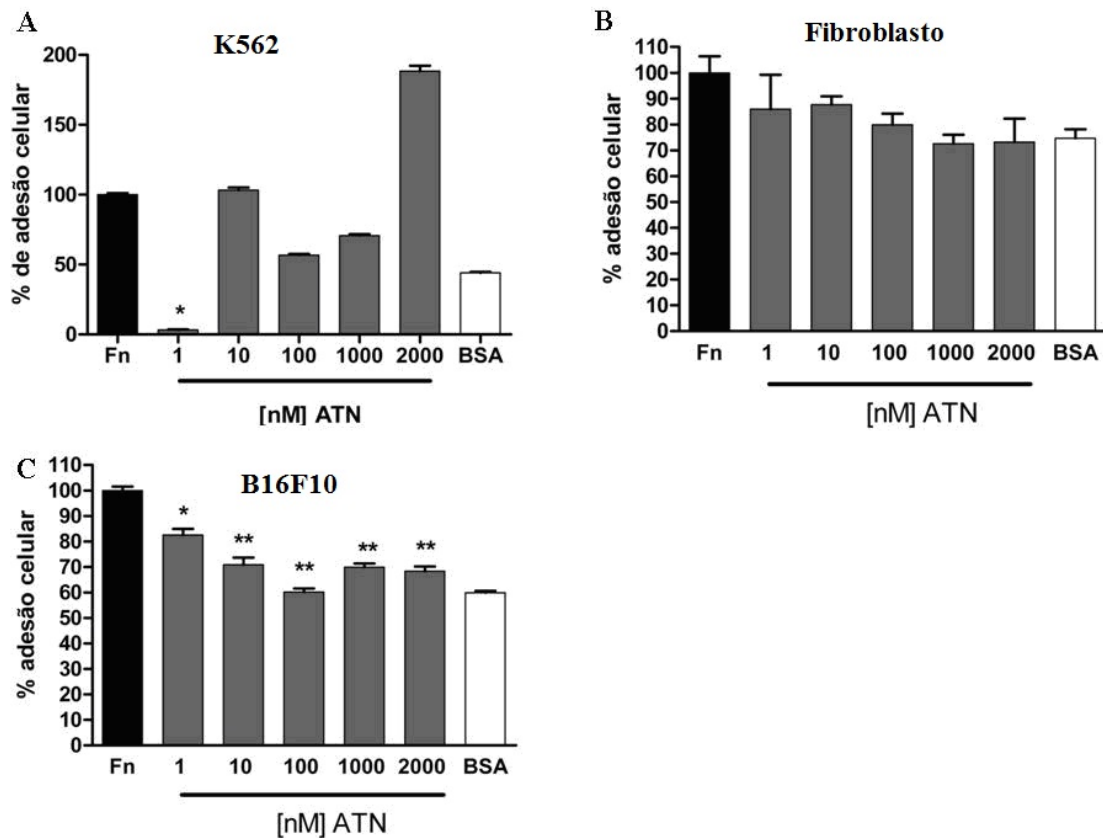


Figura 35. Desadesão celular. A: K562. B: Fibroblasto. C: ATN. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

7.10 Proliferação Celular

Ramos *et al.*, (2008) mostraram o efeito da DisBa-01 na inibição da proliferação tanto de células endoteliais (HMEC) em todas as concentrações e tempos testados quanto de células de melanoma murino (B16F10), este apenas no tempo de 24 horas mas não houve efeito sobre as células de câncer de mama, MDA-MB-231.

A ATN apresentou o mesmo efeito inibitório da proliferação celular em células tumorais de melanoma murino apenas no tempo de 48 horas, mas em todas as concentrações (figura 36 B). Em fibroblasto e nas células de câncer de mama, a ATN apresenta efeito inibitório somente em alta concentração (figura 36 A; C). Em todas as linhagens celulares estudadas, o efeito da Alternatin é predominante em 48 horas de incubação e na concentração de 2000 nM.

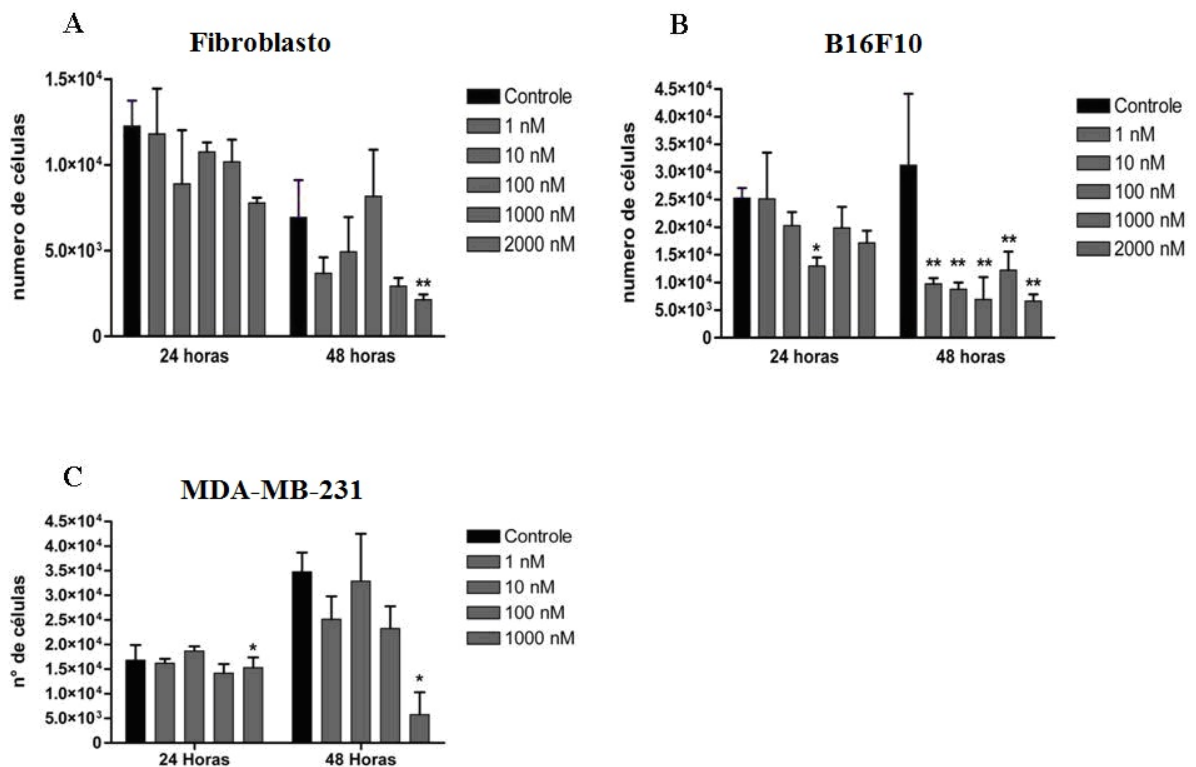


Figura 36. Inibição da proliferação celular em 24 e 48 horas de incubação com a ATN. A: Fibroblastos: inibição da proliferação em 48 horas com 2000 nM de ATN. B: B16F10: 100 nM em 24 horas já apresenta efeito inibitório mas com 48 horas todas as concentrações inibiram a proliferação destas células. C: Células MDA-MB-231 inibição da proliferação em todos os tempos testados apenas na concentração de 1000 nM. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ em relação ao controle. Teste de Dunnett.

7.11 Fragmentação de DNA

Na vertente de que a inibição da proliferação celular em 48 horas de tratamento com a ATN pudesse ser em virtude de morte celular por apoptose, foi realizada a verificação da integridade do DNA celular após as 48 horas de tratamento.

Na figura 37 não vemos a fragmentação do DNA celular (efeito escada) em nenhuma das linhagens e em nenhuma das concentrações testadas, demonstrando a ausência de morte celular do tipo apoptose.

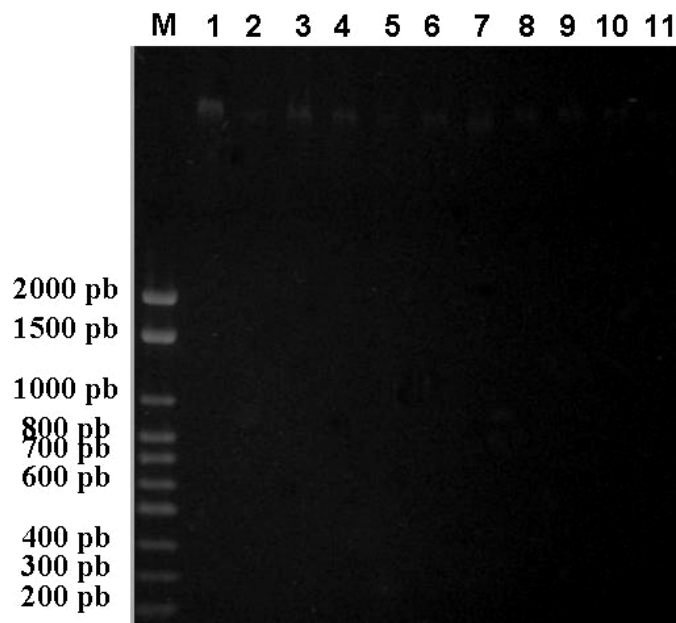


Figura 37. Fragmentação de DNA de culturas de células tratadas com ATN. Eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio para verificação de fragmentação de DNA celular, característica do processo de indução de apoptose celular. M: 1µl de Low Ranger 100pb DNA ladder (Norgen) (100-2000pb); 5µl de amostra de DNA celular (1-11): 1-4: Fibroblasto humano (0; 1; 10; 100 nM ATN); 5-8: MDA-MB-231 (0; 1; 10; 100 nM ATN); 9-11: B16F10 (0; 1; 10 nM ATN).

7.12 Competição de Ligação a Receptores na Membrana Celular

Os receptores celulares presentes nas células K562 responsáveis por promoverem a ligação dessas células com a fibronectina são os mesmos com os quais a ATN tem a capacidade de interação. Na tentativa de identificar a especificidade de ligação da ATN em relação às integrinas, ATN e anticorpos anti-subunidades das principais integrinas ligantes de fibronectina e vitronectina foram utilizados em ensaio de competição pela ligação ao receptor. Assim, foram usados os anticorpos anti- $\alpha 5$, anti- αv , anti- $\alpha v\beta 3$ e anti- $\beta 1$ e ATN nas mesmas concentrações usadas nos ensaios adesivos. As proporções totais de receptores das K562 incubada com ATN e as integrinas $\alpha 5$ e $\beta 1$ não sofreram reduções quando comparados com a proporção de receptores totais das células sem a presença da desintegrina (Figura 38 A e B). No entanto, a integrina αv teve seus sítios de ligação reduzidos em 0,53; 0,21; 0,42 e 0,68 (UA) comparado ao controle quando as K562 foram incubadas com ATN 10-1000 nM (figura 38 C). Já a competição realizada entre $\alpha v\beta 3$ e ATN nas concentrações de 100 e 1000 nM, respectivamente foi verificada uma redução de 0,33 e 0,34 (UA) (Figura 38 D).

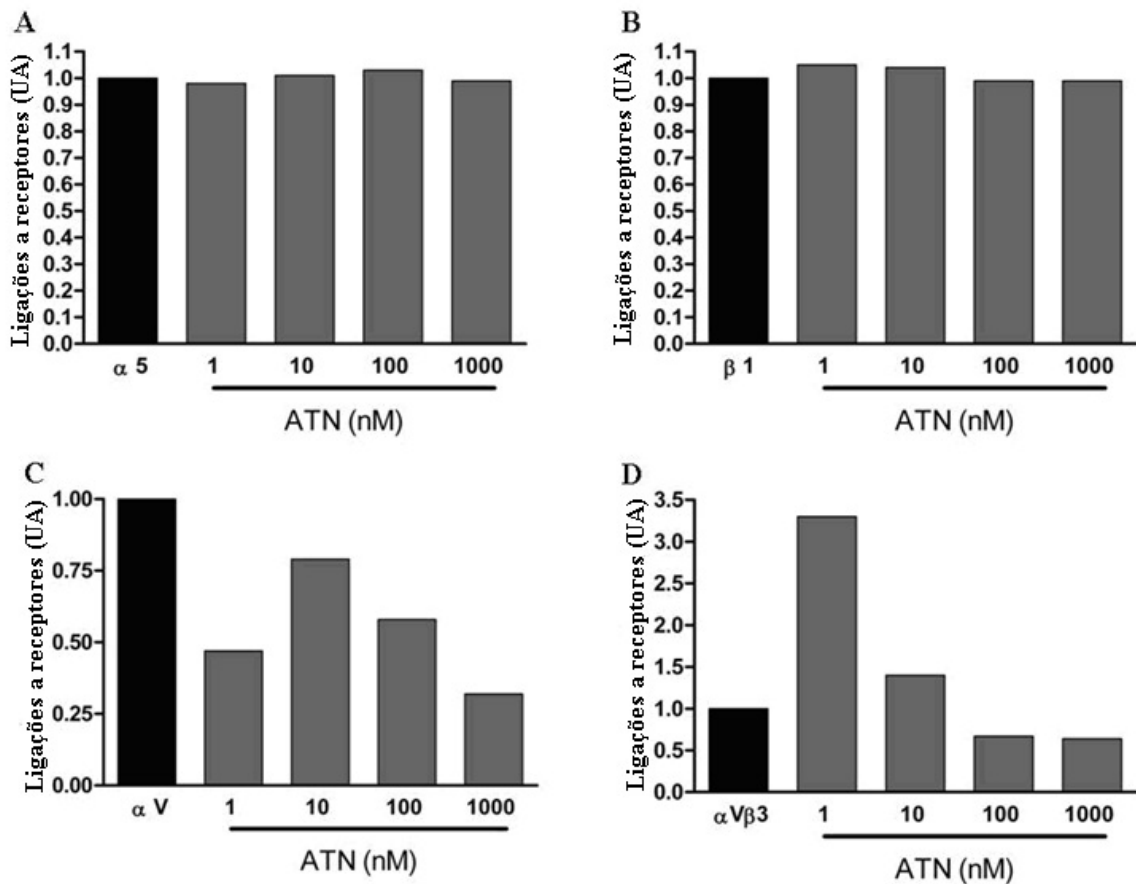


Figura 38. Competição por Anticorpos em células K562. A presença da alternatin diminuiu as proporções de receptores livres para os anticorpos anti- αV e anti- $\alpha V\beta 3$, sítios adesivos das células a fibronectina. A: ATN e $\alpha 5$; B: ATN e $\beta 1$; C: ATN e αV e D: ATN e $\alpha V\beta 3$. Experimento único.

Os receptores celulares presentes nas células de câncer de mama detectados por citometria de fluxo que apresentam afinidade a proteínas de matriz com seqüência RGD foram analisados na presença de 100 nM de ATN (concentração de maior inibição da adesão celular a fibronectina), para identificar quais os principais sítios de interação desta proteína na membrana celular desta linhagem celular. Na MDA-MB-231 os receptores celulares que mais foram influenciados, reduzindo os sítios livres para adesão a proteínas de matriz como fibronectina e vitronectina pela presença da ATN foram $\alpha V\beta 5$ (0,8) e $\alpha V\beta 3$ (0,6) (figura 39).

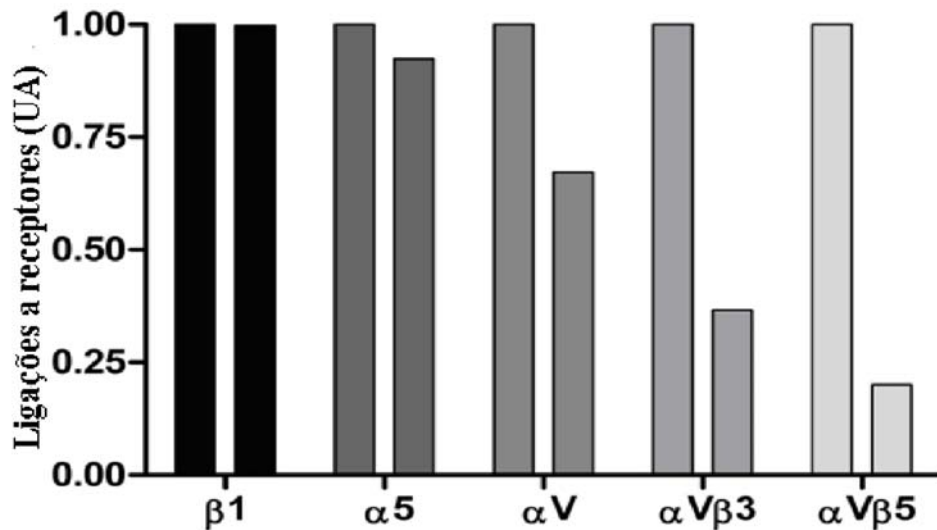


Figura 39. Efeito de 100 nM de ATN nos receptores celulares para fibronectina e vitronectina em células MDA-MB-231. A segunda barra de cada subunidade de integrina analisada é referente a incubação das células com 100 nM de ATN e posteriormente com o anticorpo específico. $\beta 1$; $\beta 1$ +ATN; $\alpha 5$; $\alpha 5$ +ATN; αV ; αV +ATN; $\alpha V\beta 3$; $\alpha V\beta 3$ +ATN; $\alpha V\beta 5$; $\alpha V\beta 5$ +ATN. Experimento único.

7.13 Atividade Basal de Gelatinases A e B _ Metaloprotease de Matriz

As metaloproteases de matriz são moléculas fundamentais no desenvolvimento do microambiente tumoral, uma vez que a atividade ou a sua expressão está relacionada com a malignidade do tumor.

A gelatinase A (MMP-2) é constitutiva das células e foi identificada pela massa molecular nos fibroblastos na sua forma intermediária (figura 40 A), e nas células de melanoma murino e MDA-MB-231 na sua forma pró-MMP-2 (figura 40 B-C). O tratamento dessas linhagens com a ATN não apresentou efeito na atividade dessa enzima.

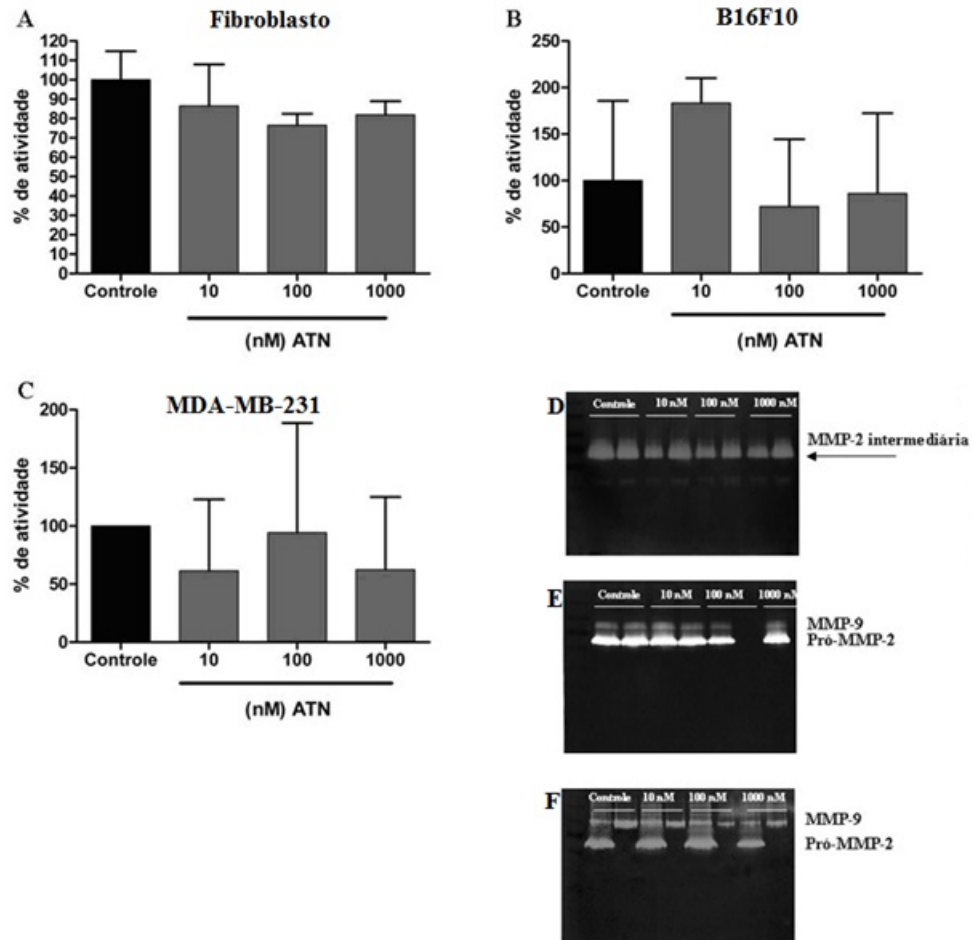


Figura 40. Atividade basal da MMP-2. As linhagens celulares Fibroblasto, B16F10 e MDA-MB-231 foram cultivadas em placa de Petri e tratadas com a desintegrina por 24 horas para identificar alterações na atividade basal dessa gelatinase induzida pela ATN. A e D: fibroblasto; B e E: B16F10; C e F: MDA-MB-231. Controle foi considerado 100% de atividade e tratamentos média % \pm erro padrão.

A MMP-9, ao contrário da MMP-2, apresenta expressão baixa e é induzida por fatores de progressão tumoral como TGF- β , TNF- α (Stuelten *et al.*, 2005). Nas linhagens estudadas, a MMP-9 foi identificada apenas nas tumorais, B16F10 (figura 41 A) e MDA-MB-231 (figura 41 B) e quando essas linhagens foram tratadas com a desintegrina não houve efeito na atividade desta enzima.

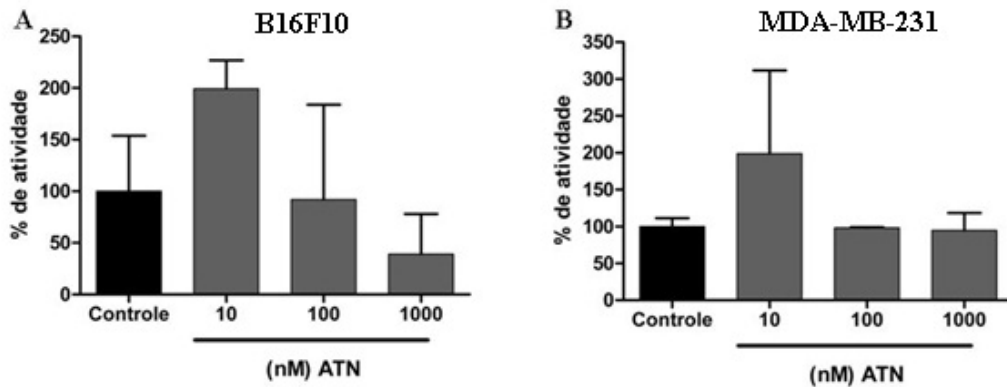


Figura 41. Atividade basal da MMP-9. As linhagens celulares B16F10 e MDA-MB-231 foram cultivadas em placa de Petri e tratadas com a desintegrina por 24 horas para identificar alterações na atividade basal dessa gelatinase induzida pela ATN. A: B16F10; B: MDA-MB-231. O controle foi considerado 100% de atividade e tratamentos média % \pm erro padrão.

7.14 Polimerização de Actina

Um dos eventos intracelulares necessários para a migração celular é o rearranjo dos filamentos de actina, um dos componentes do citoesqueleto celular. A concentração de $1\mu\text{M}$ de ATN foi efetiva em causar a despolimerização do citoesqueleto de actina nas células MDA-MB-231 Texas, uma linhagem com caráter invasivo e de desenvolver metástase óssea (figura 42), efeito esse que é capaz de inibir a habilidade das células de migrarem. Como controle positivo de alteração do citoesqueleto causado pela polimerização dos filamentos de actina foi utilizado citocalasina D.

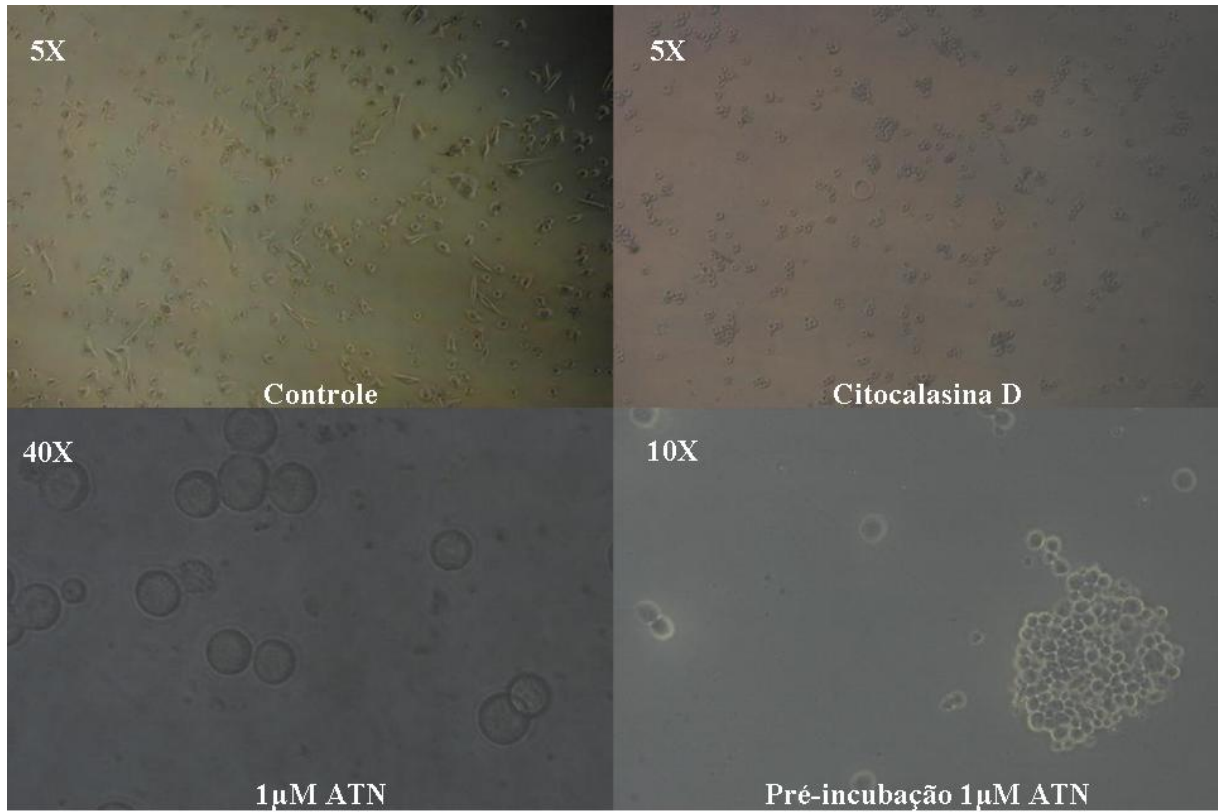


Figura 42. Despolimerização de F-Actina do citoesqueleto. As lâminas foram sensibilizadas com matrigel e as células MDA-MB-231 Texas foram semeadas 24 horas antes da adição dos tratamentos permitindo o total estabelecimento da adesão das células a matriz. As imagens foram obtidas após 4 horas de tratamento.

7.15 Invasão Celular da MDA-MB-231 Tx

A invasão de tecidos por células tumorais é um dos principais eventos do desenvolvimento metastático e nesse sentido a ATN estimulou a invasão das células MDA-MB-231 Texas (figura 43).

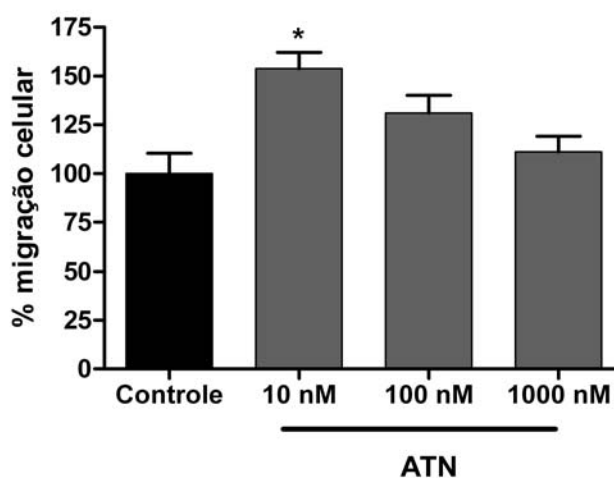


Figura 43. Baixa concentração de ATN estimula a invasão das MDA-MB-231. As células de câncer de mama foram previamente tratadas com a desintegrina por 30 minutos e permitida a migração dessas células através de matrigel. $p \leq 0,05$. Teste de Dunnett.

7.16 Migração Celular das MDA-MB-231 Tx _ Wound Healing

A capacidade migratória horizontal das células de câncer de mama MDA-MB-231 Tx tratadas com a ATN foi inibida em todas as concentrações testadas (figura 44), efeito semelhante ao já comprovado para a DisBa-01 (SELISTRE-DE-ARAUJO *et al.*, 2010).

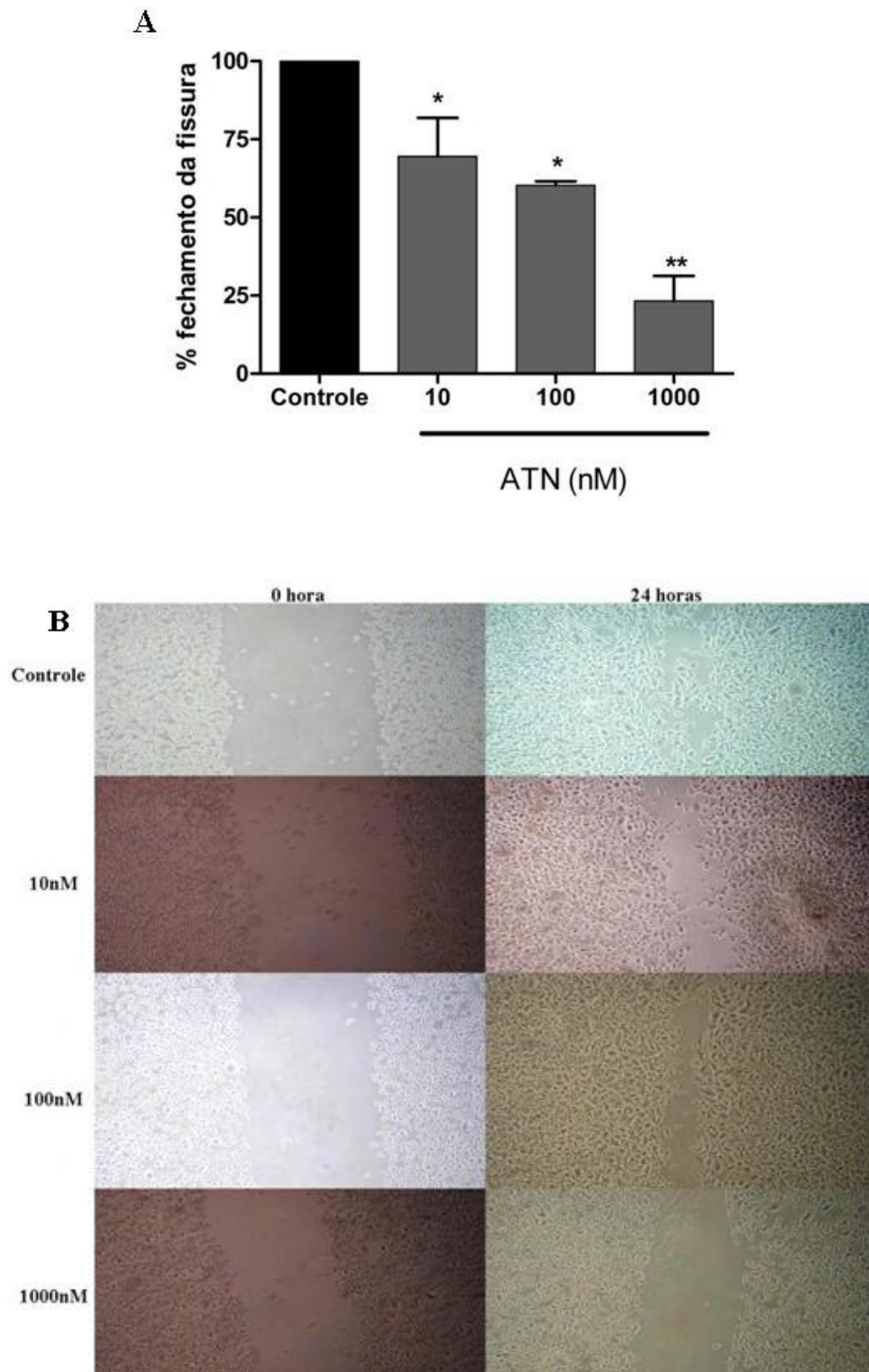


Figura 44. ATN inibe a migração de MDA-MB-231 Tx. As células de câncer de mama em 24 horas de tratamento com a desintegrina RGD recombinante tiveram sua movimentação reduzida. A: a porcentagem de fechamento da fissura foi calculada segundo a fórmula: $(\text{área T 0h} - \text{área T 24h}) / \text{área controle} * 100$; $*p \leq 0,05$ e $**p \leq 0,01$. Teste de Dunnett. B: imagens T 0 hora e imagens T 24 horas (objetivas 10X).

8. Discussão

A progressão tumoral e metástase são resultado da disfunção de processos celulares cujas vias de sinalização são, de modo geral, dependentes de integrinas e, neste sentido é que terapias anti-tumorais estão utilizando moléculas capazes de interagir com esse tipo de receptor. Antagonistas de moléculas de adesão como as desintegrinas são conhecidas por serem capazes de interagir com alta afinidade e seletividade com integrinas. No entanto, estudos demonstram que essa função é dependente do tipo celular quando se trata de desintegrinas RGD (COELHO *et al.*, 2004).

Atualmente, após anos de pesquisas com essas moléculas, elas se tornaram modelo para estudo de diversos processos fisiológicos e patológicos assim como fonte para o desenvolvimento de fármacos. No entanto, para o uso dessas moléculas como um protótipo de fármaco e a obtenção dessas deve ser contínua. A expressão heteróloga vem ao encontro a essa necessidade além de preservar a continuidade do uso de moléculas bioativas presentes nas peçonhas de espécies ameaçadas de extinção. A escolha do sistema de expressão heteróloga é de extrema importância. A expressão em sistemas eucarióticos como em leveduras ou células de mamíferos apresentam a vantagem de realizar modificações pós-traducionais, no entanto são sistemas de expressão mais caros e demorados comparados ao sistema bacteriano o qual oferece ainda um maior rendimento em termos de concentração de proteína.

A formação das pontes de dissulfeto é essencial no estabelecimento da estrutura conformacional correta e conseqüentemente no desempenho da sua atividade biológica em especial para proteínas ricas em cisteína. Para McLane e colaboradores (2005), a expressão de desintegrinas em sistemas bacterianos afeta a atividade das proteínas pela má formação das pontes de dissulfeto sendo o mais indicado atualmente o uso de sistema recombinante em *Pichia pastoris* que permite a formação adequada das pontes de dissulfeto e modificações pós-traducionais. No entanto há diversos casos de desintegrinas ativas expressas em sistemas bacterianos como, por exemplo, a contortostatina (MINEA *et al.*, 2005); r-mojastina 1 (SÁNCHEZ *et al.*, 2010); jararagina (TANJONI *et al.*, 2010), insularina (DELLA-CASA *et al.*, 2011) e a DisBa-01 (RAMOS *et al.*, 2008). Entretanto, desintegrinas recombinantes são menos ativas comparadas às nativas, um exemplo é o IC₅₀ da mojestatina

nativa e da recombinante, 19,3 nM e 46 nM respectivamente (SÁNCHEZ, *et al.*, 2010). Além disso, essas proteínas co-expressas com peptídeos de fusão, como a glutathione S-transferase (GST) ou sequência de 6 histidinas introduzidas pelos vetores de expressão podem desencadear efeitos imunogênicos nos organismos.

Neste trabalho, a *DisBa-01*, uma desintegrina RGD recombinante ativa e com efeitos anti-trombótico e antitumoral teve o gene subclonado no mesmo sistema de expressão bacteriano sem o peptídeo de fusão (sequência de 6 histidinas) obtido pela troca dos sítios de clonagem. A desintegrina RGD sem o peptídeo de fusão foi denominada alternatina (ATN) e a avaliação da atividade antitumoral dessa nova construção se fez necessária.

Os resultados obtidos com a ATN neste trabalho mostraram que apesar da produção recombinante ter sido realizada em sistema bacteriano, que segundo a literatura não é o indicado para proteínas ricas em cisteína, a desintegrina foi expressa na sua forma solúvel e a detecção da atividade de ligação com integrinas nos permite dizer que as pontes de dissulfeto foram estabelecidas de modo a deixar exposto o motivo inibitório RGD.

O método de expressão da ATN em *E.coli* (BL21DE3) é comparável ao da *DisBa-01*, o que permite dizer ser uma produção eficiente, uma das vantagens oferecida pelo sistema de expressão bacteriano. A banda protéica referente à ATN (~10 kDa) é vista na altura de 12 kDa no gel de poliacrilamida de 12,5%. Essa migração anômala da desintegrina foi observada também na eletroforese de outras desintegrinas, como é o caso da acutina (YEH *et al.*, 1998) e da própria *DisBa-01* (RAMOS *et al.*, 2008). Este fato se deve ao marcador de massa molecular ser composto por proteínas globulares e a desintegrina ser uma proteína se estrutura de folhas betas e alfa hélices e sim apenas alças e sequências lineares.

A eliminação da sequência de 6 histidinas pela troca do sítio de clonagem ofereceu uma vantagem bioquímica. Diferentemente do que ocorre na produção da *DisBa-01* (RAMOS *et al.*, 2008) e utilizando a mesma cepa bacteriana, a ATN foi obtida na sua forma solúvel, sendo recuperada já no primeiro sobrenadante (S1). A obtenção da ATN no sobrenadante não desnaturante trouxe uma vantagem para a formação da estrutura uma vez que não é necessário o uso de nenhum agente desnaturante que ocasiona desenovelamento e desnaturação de proteína. No entanto, a ausência da cauda de histidina impossibilita o uso de cromatografia de afinidade, um método de purificação rápido e fácil com grande rendimento protéico.

O método de purificação estabelecido para o isolamento da desintegrina utilizou inicialmente o princípio de separação de moléculas por exclusão da massa molecular,

um método eficiente na separação em categorias: alta, média e pequena massa molecular em se tratando de misturas complexas como é o caso de sobrenadante de cultura de bactéria. Com a redução da complexidade da mistura e refinando a purificação, uma cromatografia baseada em interação de cargas como é o caso da coluna MonoQ 5/50GL foi realizada permitindo a obtenção final de 0,9 mg/L de expressão bacteriana. Este rendimento é considerado baixo no uso do sistema bacteriano e menor do que o obtido para a DisBa-01 (5mg/litro) (RAMOS *et al.*, 2008). Outras desintegrinas recombinantes fusionadas apresentam um rendimento maior ao apresentado pela ATN como é o caso da HF3 1mg/litro (MENEZES *et al.*, 2008), botrostatina 6mg/L (FERNANDEZ *et al.*, 2005) mas a r-mojastatina 1 apresenta um rendimento semelhante a ATN (3,3 mg/4 litros) (SÁNCHEZ *et al.*, 2010).

Deste modo, a ausência do peptídeo de fusão permitiu uma alta expressão da desintegrina na sua forma solúvel e ativa, uma vez que foi capaz de inibir a agregação plaquetária (dados não mostrados_ comunicação pessoal), mas o processo de isolamento da desintegrina deve ser revisto no sentido de aumentar o rendimento final.

Uma alternativa na purificação e que resultaria no aumento do rendimento da produção da desintegrina seria o uso da coluna de afinidade de anticorpos construída com anticorpos específicos para a ATN. Anticorpos anti-DisBa-01 foram produzidos em coelhos e apresentaram alta especificidade à ATN e baixa reatividade com outros tipos de proteínas presentes no lisado bacteriano. No entanto, a adsorção da fração IgG purificada a resina ativada não foi eficiente já que a ATN do sobrenadante bacteriano não ficou adsorvida aos anticorpos apesar deles apresentarem reatividade a ATN em imunoblotting . A possível causa da ineficiência da coluna de afinidade de anticorpos é uma baixa quantidade da fração de IgG adsorvida à resina sendo necessária uma solução mais saturada na ativação da resina com os anticorpos. Outras alternativas de purificação como por exemplo o uso de fase reversa podem ser usadas já que diversas desintegrinas inclusive recombinantes são purificadas com o uso deste tipo de cromatografia, como é o caso da contortrostatina recombinante (MINEA *et al.*, 2008).

Caracterizadas como moléculas antitumorais *in vitro* e *in vivo* (TIAN *et al.*,2007), desintegrinas RGD como a echistatina, contortrostatina, salmosina são capazes de alterar a morfologia de células tumorais e propriedades biológicas (CORREA *et al.*,2002). Essas moléculas exibem forte ligação específica com as integrinas $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ e $\alpha5\beta1$ inibindo a angiogênese relacionada com crescimento tumoral (TIAN *et al.*,2007), invasão

celular (ZHOU *et al.*,2000),e metástase (ZHU *et al.*,2010) e com a integrina α Iib β 3, inibindo a agregação plaquetária (MARCINKIEWIEZ,2005).

A DisBa-01 interage com diversas integrinas dependentes da ligação RGD que são expressas nas células tumorais, plaquetas e células endoteliais. Foi demonstrado nos últimos anos (RAMOS *et al.*, 2008; KAUSKOT *et al.*, 2008; SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2010; MONTENEGRO *et al.*, artigo submetido), a ação da DisBa-01 inibindo diversos passos no progresso tumoral e angiogênese, atuando principalmente nas células tumorais e nas células endoteliais. Esses efeitos antitumorais e anti-angiogênicos foram obtidos com a desintegrina fusionada à cauda de histidina.

A apoptose é um evento mediado por integrina onde a ausência de adesão à MEC induz a ativação da Caspase-8 levando a morte celular. Além disso, a redução na fosforilação da FAK e das proteínas associadas deixam de ativar a Akt, o que leva à ativação das caspases, no caso Casp-9, iniciando a sinalização para apoptose (STUPACK *et al.*, 2001). A desadesão de células tumorais aderidas à MEC é um efeito desejado somente se esse descolamento iniciar o processo de *anoikis* ou apoptose celular. As células de melanoma murino, B16F10, aderidas à fibronectina e as K562 (na menor concentração) tiveram essa adesão perturbada pela ATN provocando descolamento da proteína de matriz. Esse descolamento pode causar a formação de agregados multicelulares como visto nas células HCASMCS tratada com saxatilina (SOHN *et al.*,2008) e esse agregado pode não aderir a matriz, como visto no tratamento das células MDA-MB-231 com ATN.

A alteração na adesão das células à MEC pode iniciar a migração, um importante passo no desenvolvimento metastático. Durante este processo, a formação de contatos focais promove a clusterização de integrinas, aumentando a autofosforilação da FAK e, possibilitando a formação do complexo FAK-talina-paxilina que conduz a polimerização da actina do citoesqueleto e formação de fibras de estresse, causando um remodelamento do citoesqueleto e permitindo a motilidade da célula. A principal condutora desse processo é a integrina α v β 3 (KIM *et al.*, 2003). A ATN, uma desintegrina cujo principal alvo nas células de câncer de mama MDA-MB-231 é a integrina α v β 3, inibe a migração dessas células de maneira concentração dependente. A inibição da migração celular é visto ser inerente de muitas desintegrinas. A DisBa-01 foi eficiente na inibição da migração de fibroblastos e de duas linhagens tumorais, MDA-MB-231 e DU-145 (SELISTRE-DE-ARAÚJO *et al.*, 2010), a

contortostatina inibe a migração de células endoteliais, HUVEC, (GOLUBKOV *et al.*, 2003), a eristostatina inibe a migração de células de melanoma (MCLANE *et al.*, 2005).

Além disso, foi verificada neste sentido uma alteração na morfologia celular das células MDA-MB-231 tratadas com ATN. As células tornaram-se retraídas e arredondadas, efeito semelhante ao da citocalasina D que desorganiza a actina do citoesqueleto, o que pode levar a desfazer os contatos focais e assim impedir a migração celular. Este efeito não é exclusivo da ATN, outras desintegrinas, por exemplo, a saxatilina também provoca alteração na morfologia da HCASMCs e inibe a migração celular (SOHN *et al.*, 2008).

Outro processo celular influenciado pelas desintegrinas é a invasão, o qual associa migração celular com degradação da MEC. Neste cenário, a MMP é uma molécula de grande importância e o aumento da expressão de duas delas, MMP-2 e MMP-9, está intimamente associadas à metástase. No entanto, estudos já demonstraram que a expressão da MMP-2 não é influenciada pelas desintegrinas, como por exemplo, a não alteração da atividade de MMP-2 por células endoteliais tratadas com contortostatina (CN) (GOLUBKOV *et al.*, 2005), assim como a rodostomina também não alterou a atividade de MMP-2 pelas células de melanoma (YANG *et al.*, 2005), resultados semelhantes ao encontrado com a ATN tanto com células normais quanto tumorais. No entanto, a expressão da MMP-9 encontra-se reduzida em alguns casos como da saxatilina (KIM *et al.*, 2007) inibindo a invasão tumoral.

A MMP-9 além de ajudar no extravasamento das células tumorais, media a liberação de VEGF estimulando a angiogênese (THIOLLOY *et al.*, 2009). A regulação da MMP-9 ocorre através da regulação da transcrição gênica, da atividade pós-traducional ou é regulada pelas TIMPs (KIM *et al.*, 2007). Kim e colaboradores utilizando a saxatilina e células de melanoma identificaram a influência da integrina $\alpha\beta3$ na regulação da expressão da MMP-9 através da regulação da expressão da TIMP-1 no processo de invasão celular. No entanto, Golubkov e colaboradores (2003) não verificaram alteração da expressão de MMP-9 por células endoteliais em contato com CN apesar da invasão ter sido inibida por esta desintegrina. Em relação à MMP-9 não podemos afirmar que as desintegrinas não exerçam efeitos modulatórios como acontece com a MMP-2, entretanto podemos afirmar que é célula específica, uma vez que em fibroblasto a DisBa-01 inibiu a expressão da MMP-9 e com MDA-MB-231 a expressão foi induzida ambos durante a migração dessas células

(MONTENEGRO *et al.*, dados não publicados). O mesmo efeito foi visto com a ATN e MDA-MB-231 em baixa concentração, o que resultou em tendência a um estímulo à invasão destas células apesar de não ser significativo.

A capacidade da ATN de agir como uma molécula capaz de promover a adesão celular, mimetizando uma proteína de matriz não foi vista utilizando uma linhagem celular em suspensão como é o caso da célula de eritroleucemia humana, K562, no entanto, esse fato não exclui a possibilidade da ATN ser uma molécula de adesão para outros tipos celulares.

Diversos processos normais ou patológicos são dependentes da adesão celular. Como é visto em diversos trabalhos com desintegrinas (RAMOS *et al.*,2008; GALAN *et al.*,2008), as desintegrinas RGD são capazes de inibir a adesão de diferentes células tumorais a proteínas de matriz como fibronectina, vitronectina, colágeno tipo I, colágeno tipo IV. A inibição da adesão à fibronectina pela ATN demonstrou ser concentração dependente para K562 e B16F10. A MDA-MB-231 apresenta inibição apenas na concentração de 100 nM e o fibroblasto teve sua adesão inibida somente na concentração mais alta testada, 2000 nM. Assim verificamos uma susceptibilidade diferente das células à ATN em razão do padrão diferencial de integrinas nas células.

A adesão à fibronectina é mediada por diferentes tipos de receptores dentre eles, pelo menos 12 são dependentes de integrinas e 9 são capazes de reconhecer a sequência RGD tais como as integrinas $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ e $\alpha5\beta1$ e outras (TIAN *et al.*,2010). Identificamos uma redução da disponibilidade da integrina $\alpha\beta3$ e da subunidade $\alpha\upsilon$ para as células K562 tratadas com a ATN e as integrinas $\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$ para as células MDA-MB-231. Juntamente com os resultados de inibição da adesão identificamos a integrina $\alpha\beta3$ como alvo de ligação da ATN, assim como acontece com a saxatilina e rodostomina (YANG *et al.*, 2005; SOHN *et al.*, 2008). Esse dado corrobora com o resultado visto por Ramos e colaboradores (2008), no qual o docking entre a DisBa-01 e a integrina $\alpha\beta3$ permitiu a visualização da interação da desintegrina RGD na porção $\beta3$ da integrina. Esta inferência é de grande valia para o prosseguimento dos estudos uma vez que a integrina $\alpha\beta3$ tem sido reportada como uma integrina importante no processo de invasão de células tumorais e conseqüentemente, metástase. Um fato interessante encontrado foi a ausência de efeito da ATN com as subunidades $\alpha5$ e $\beta1$, subunidades de interação com proteínas RGD, o mesmo ocorreu com a rodostomina, uma desintegrina RGD (YANG *et al.*,2005).

Após a sobrevivência na corrente sanguínea, a colonização do sítio secundário depende da adesão e da proliferação das células tumorais. O ciclo celular é outro processo regulado pelas integrinas. O uso de antagonistas de integrinas geralmente leva à redução da fosforilação da FAK e conseqüentemente inibe a fosforilação da ERK regulando o ciclo celular. Eristostatina (3 μ M) não teve efeito sobre o ciclo celular de células de melanoma até 48 horas de incubação (TIAN *et al.*, 2007). Já DisBa-01, em 24 horas inibiu 35% da proliferação de B16F10 e não teve efeito sobre a proliferação das células MDA-MB-231 (RAMOS *et al.*, 2008). No entanto, o ciclo celular foi influenciado em 48 horas de incubação com a ATN, inibindo a proliferação das células tumorais, concentração e tempo dependente nas B16F10 e MDA-MB-231 provavelmente induzindo as células permanecerem em estado quiescente. Diferentemente da salmosina e da equistatina, desintegrinas RGD capazes de induzir apoptose (SCHMITMEIER *et al.*, 2005), a ATN não interferiu na viabilidade celular e não mostrou ser capaz de induzir apoptose nas células tumorais, pois uma das marcas de apoptose que é a fragmentação do DNA celular não foi identificado em nenhuma das células tumorais tratadas com ATN. Este resultado é semelhante aos encontrados em estudos envolvendo a rodostomina (YANG *et al.*, 2005) a contortostatina (SCHMITMEIER *et al.*, 2005) e a DisBa-01 (KAUSKOT *et al.*, 2008) que assim como a ATN testaram concentrações menores do que as concentrações de salmosina e equistatina capazes de induzir a apoptose (SCHMITMEIER *et al.*, 2005).

Além disso, os efeitos antitumorais inerentes desta molécula foram mantidos através do papel inibitório na adesão, proliferação e migração de células tumorais, principalmente daquelas que super-expressam a integrina $\alpha\beta_3$, pontos chaves na progressão tumoral e metástase. Por ser antagonista da integrina $\alpha\beta_3$, esta desintegrina poderá atuar nas células endoteliais nascentes e células tumorais que super-expressam esse tipo de integrina. Ao mesmo tempo, outra vantagem foi obtida, a redução no IC₅₀ da ATN, muito importante na comparação do poder de ação de moléculas.

Estudos relativos ao papel anti-angiogênico devem ser conduzidos juntamente com a verificação da redução da citotoxicidade da molécula pela ausência do peptídeo de fusão para que estudos *in vivo* possam ser conduzidos. Assim, modos de entrega eficiente da molécula devem ser testados, uma opção é o uso de lipossomas como acontece com a contortostatina (SWENSON *et al.*, 2004) ou transfecção do gene da ATN em lipossomas como ocorre com a salmosina (KIM *et al.*, 2003).

Deste modo, identificamos eventos da cascata metastática e moléculas relacionadas que são modulados pela presença da alternatina, uma desintegrina RGD recombinante de *Bothrops alternatus*, antagonista da integrina $\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$.

9. Conclusões

Durante o desenvolvimento deste trabalho obtivemos várias evidências que sustentam a ação da desintegrina RGD de *Bothrops alternatus* (DisBa-01 e ATN) como um promissor agente anti-metastático. Estas moléculas mostraram capacidade de interferir em diversas etapas do processo metastático como adesão das células tumorais às proteínas da MEC em sistema de fluxo e estático, assim como interferir no processo migratório das células tumorais de câncer de mama, pontos-chaves no extravasamento celular, que culmina no estabelecimento de um sítio secundário de tumor.

Essas moléculas comparadas aos peptídeos sintéticos cíclicos desenhados baseado muitas das vezes na estrutura dessas moléculas, apresentam vantagens bioquímicas como, por exemplo, de serem de fácil internalização pelas células e ação intracelular. A ATN em especial, em razão da alteração no sistema de produção da desintegrina, gerou uma vantagem farmacológica referente ao IC₅₀ que diminuiu em comparação a DisBa-01, manteve a característica de ser uma antagonista da integrina $\alpha\beta_3$, presente nos principais eventos metastáticos e alvo das terapias anti-metastáticas atuais. Além disso, a ATN por ser uma molécula ainda menor que a DisBa-01 apresenta uma outra vantagem, de ser de fácil difusão ou de ser carregada no interior de lipossomas e de ação específica.

Tabela 2. Resumo das características desenvolvidas pela ATN.

Características	ATN
Moleculares	Sequência da Desintegrina: 236 pb pET28a sem seqüência de Histidina N-terminal e S-transferase
Bioquímicas	Proteína expressa sem <i>Histag</i> Proteína Solúvel Rendimento: 0,9mg/L Sequência Adesiva: RGD Reatividade com anticorpo anti-DisBa-01 de coelho e camundongo. Isolamento protéico: 2 Cromatografias de Exclusão Molecular; Cromatografia de Troca-Iônica; Centricon 30

Celulares	<p>Promoção da Adesão: K562: não promove</p> <p>Adesão K562: inibição a partir de 1 nM</p> <p>Adesão MDA-MB-231: inibição a 100 nM</p> <p>Adesão Fibroblasto: inibição em 2000 nM</p> <p>Adesão B16F10: inibição a partir de 1 nM</p> <p>Desadesão K562: 1 nM.</p> <p>Desadesão B16F10: a partir de 1 nM.</p> <p>Desadesão Fibroblasto: sem atuação.</p> <p>Proliferação Fibroblasto: inibe com 2000 nM em 48 horas.</p> <p>Proliferação MDA-MB-231: inibe com 100 nM em 24 e mantém em 48 horas.</p> <p>Proliferação B16F10: inibe com 100 nM em 24 horas e em 48 horas a partir de 1 nM.</p> <p><i>Wound Healing</i> MDA-MB-231: inibição da migração em 24 horas.</p> <p>Invasão MDA-MB-231: estimulação.</p> <p>Expressão basal MMP-2: alterada em fibroblasto, MDA-MB-231 e B16F10.</p> <p>Expressão basal MMP-9: alterada em B16F10 e MDA-MB-231</p> <p>Apoptose: não promove fragmentação de DNA.</p> <p>Receptores Celulares: reduz a disponibilidade dos receptores α_v, $\alpha_v\beta_3$ de K562; α_v, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ de MDA-MB-231.</p> <p>Citoesqueleto de Actina: 1 μM promove alteração na actina.</p>
-----------	--

Portanto, é possível afirmar que tanto a DisBa-01 quanto a ATN, desintegrinas RGD recombinantes de *Bothrops alternatus* pelos efeitos demonstrados neste trabalho como em trabalhos paralelos a este, são moléculas com ação anti-trombótica e anti-metastática com características desejáveis para uma candidata a protótipo de fármacos em terapias referentes ao câncer.

10. Referências

ANGIOGENESIS FOUNDATION. Disponível em :<<http://www.angio.org>>. Acesso em: 05/17/2011.

ARSHAD,F. *et al.* Blood-Brain Barrier Integrity and Breast Cancer Metastasis to the Brain. **Patholog. Res. Int.**, v. 2011, p.1-12, 2011.

BACHELDER, R.E; WENDT, M.A; MERCURIO, A.M. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. **Cancer Res.**, v.62, p.7203-06, 2002.

BARJA-FIDALGO, C. *et al.* Disintegrins: integrin selective ligands which activate integrin-coupled signaling and modulate leukocyte functions. **Braz J Med Biol Res.** v.38, p.1513-1520, 2005.

BERGER, B. *et al.* Defective p53 antiangiogenic signaling in glioblastoma. **Neuro Oncol.**, v.12, n.9, p.894-907, 2010.

BERRIER, A.L.;YAMADA, K.M. Cell-Matrix Adhesion. **J.Cell.Physiol**, v.213, p.565-573, 2007.

BERTIN,S. *et al.* Tumor microenvironment modifications induced by soluble VEGF receptor expression in a rat liver metastasis model. **Cancer Lett.**, v.298, p.264-272, 2010.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol.Ther.**, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994.

BJARNASON 1989

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer.**Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro,2009,98p.

CALVETE, J. J. *et al.* Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. **Biochem.J.**, v.372, npt 3, p.725-734, 2003.

CAO,J.; ZUCKER,S. **Biology and chemistry of matrix metalloproteinases (MMPs).** Disponível em :<<http://www.abcam.com>>.Acesso em: 05/17/2011.

CASANOVAS O. *et al.* Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signalling in late-stage pancreatic islet tumors. **Cancer Cell** ,v. 8,n.4,p. 299-09, 2005.(VERIFICAR)

CAWSTON, T.E. Metalloproteinase Inhibitors and the Prevention of Connective Tissue Breakdown. **Pharmacol. Ther.**, v.70, p.163-182, 1996.

CHENG, Y.-C. *et al.* Lipopolysaccharide upregulates uPA, MMP-2 and MMP-9 via ERK1/2 signaling in H9c2 cardiomyoblast cells. **Mol. Cell. Biochem.**, v.325, p.15-23, 2009

CHOW, A.K. *et al.* Acute actions targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. **Br. J. Pharmacol.**, v.152, n.2, p.189-205, 2007.

CHUNG, A.S.; FERRARA, N. The Extracellular Matrix & Angiogenesis: Role of The Extracellular Matrix in Developing Vessels and Tumor Angiogenesis. **Pathways**, v.11, p.3-2-5, 2010.

CHUNG, J.; MERCURIO, A.M. Contributions of the $\alpha 6$ integrins to Breast Carcinoma Survival and Progression. **Mol. Cells**, v.17, n.2, p.203-209, 2004.

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.

COMINETTI, M. R. *et al.* Inhibition of platelets and tumor cell adhesion by the disintegrin domain of human ADAM9 to collagen I under dynamic flow conditions. **Biochemie**, v.91, p.1045-1052, 2009.

COMINETTI, M. R. *et al.* Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. **J. Biol. Chem.**, v.279, n.18, p.18247-18255, 2004.

COOPER, C.R.; CHAY, C.H.; PIENTA, K.J. The role of $\alpha \nu \beta 3$ in Prostate Cancer Progression. **Neoplasia**, v.4, n.3, p.191-194, 2002.

CORRÊA, M.C. JR. *et al.* Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin. **Toxicon**, v.40, n.6, p.739-748, 2002.

DAVIS, G.E; SENGER, D.R. Endothelial extracellular matrix : biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. **Circ Res.**, v.97, n.11, p.1093-107, 2005.

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.123-133, 2011.

ELICEIRI, B.P.; CHERESH, D.A. Adhesion events in angiogenesis. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.13, p.563-568, 2001.

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

FERNADEZ, J.H., SILVA, C.A., ASSAKURA, M.T. *et al.* Molecular cloning, functional expression, and modeling of bothrostatin, a new highly active Disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v.329, p. 457-464, 2005.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. 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, p. 3016-3030, 2008.

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, p.1186-1196, 2008.

GIANCOTTI, F.G. *et al.* Integrin Signaling. **Science**, v.285, p.1028-1032, 1999.

GOLUBKOV, V.; HAWES, D.; MARKLAND, F.S. Anti-angiogenic activity of contortrostatin, a Disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix* snake venom. **Angiogenesis**, v.6, p. 231-224, 2003.

GOMES, N. *et al.* Breast adenocarcinoma cell adhesion to the vascular subendothelium in whole blood and under flow conditions: effects of alphavbeta3 and alphaIIIbeta3 antagonists. **Clin. Exp. Metastasis.**, v.21, p.553-561, 2004.

GONZÁLEZ-RIVERA, A. *et al.* Epidemiología de las mordeduras por serpiente. Su simbolismo. **Acta Pediátrica de México**, v. 30, n. 3, p. 182-191, 2009.

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.

HAYASHIDA, T. *et al.* Cooperation of cancer Stem Cell Properties and Epithelial-Mesenchymal Transition in the Establishment of Breast cancer Metastasis. **J. Oncol.**, v. 2011, p.1-7, 2011.

HO, P. L. *et al.* Angiostatin-like molecules are generated by snake venom metalloproteinases. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.294, p.879-885, 2002.

HOOPER, N.M. Families of Zinc metalloproteases. **FEBS Lett.**, v. 354, p. 1-6, 1994.

HYNES, R.O. Millenium Issue - Cell adhesion old and new question. **Trends Genet.**, v.15, p.M33, 1999.

JAIN, S.; HARRIS, J.; WARE, J. Platelets: linking hemostasis and cancer. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.30, n.12, p. 2362-67, 2010.

JEMAL, A. *et al.* Cancer Statistics, 2010. **CA Cancer J Clin.**, v.60, p.277-300, 2010.

- JIA, L. G. *et al.* W. Snake Venom Metalloproteinases: Structure, Function and Relationship to the ADAMS family of proteins. **Toxicon**, v.34, p.1269-1276, 1996.
- JIN, H.; VARNER, J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. **Br. J. Cancer**, n. 90, p. 561-65, 2004.
- KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblast in Cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v.6, p.392-401, 2006.
- KAPLAN, R.N.; RAFFI, S.; LYDEN, D. Preparing the "Soil": The Premetastatic Niche. **Cancer Res**, 66(23):11089-93, (2006).
- KARALLIEDDE, L. Animal toxins. **Brit. J. Anaest.**, v.74, p. 319-327, 1995.
- KAUSKOT, A. *et al.* Hemostatic effects of recombinant DisBa-01, a disintegrin from *Bothrops alternatus*. **Front Biosci.** v.13, p.6604-6616, 2008.
- KIM, S.I. *et al.* Inhibitory effect of the salmosin gene transferred by cationic liposomes on the progression of B16BL6 tumors. **Cancer Res**, v.63, p.6458-6462, 2003.
- KIM, D.S. *et al.* Saxatilin, a Snake Venom Disintegrin, Suppresses TNF- α -Induced Ovarian Cancer Cell Invasion. **J. Bioch. Mol. Biol.**, v.40, n.2, p.290-294, 2007.
- KLEIN, T.; BISCHOFF, R. Active metalloproteases of the A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) family: biological function and structure. **J Proteome Res.**, v.10, n.1, p.17-33, 2011.
- KNIGHT, L.C. *et al.* Differences in Binding of ^{99m}Tc-Disintegrins to Integrin α v β 3 on Tumor and Vascular cells. **Nucl. Med. Biol.**, v.34, n.4, p.371-381, 2007.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.680-685, 1970.
- LEITINGER, B.; HOHENESTER, E. Mammalian collagen receptors. **Matrix Biol.**, v.26, n.3, p.146-153, 2007.
- LEWIS, R.J., GARCIA, M.L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nat. Rev.**, v.2, p.790-802, 2003.
- LI, S.G. *et al.* Correlation of integrin β 3 mRNA and vascular endothelial growth factor protein expression profiles with the clinicopathological features and prognosis of gastric carcinoma. **World J. Gastroenterol.**, v.14, n.3, p.421-427, 2008.
- MA, D. *et al.* A novel family of RGD-containing disintegrins (Tablysin-15) from the salivary gland of the horsefly *Tabanus yao* targets α IIb β 3 or α V β 3 and inhibits platelet aggregation and angiogenesis. **Thromb. Haemos.**, v.105, p.1-14, 2011.
- MA, Y-Q.; QIN, J.; PLOW, E.F. Platelet integrin α IIb β 3: activation mechanisms. **J. Thromb. Haemost.**, v.5, p. 1345-1352, 2007.
- MAKRILIA, N. *et al.* Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer. **Cancer Invest.**, v.10, p.1023-1027, 2009.

- MARCINKIEWICZ,C. Functional characteristic of snake venom disintegrins: potential therapeutic implication. **Curr.Pharm.Des.**, v.11, n.7, p.815-27, 2005.
- MARIANO-OLIVEIRA, A. *et al.* Alternagin-C, a nonRGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. **Eur.J.Biochem.**, v. 270, n. 24, p.4799-4808, 2003.
- MBEUNKUI,F.,JOHANN JR, D.J. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. **Cancer Chemother Pharmacol.** v.63, n.4, p.571-582, 2009.
- MCLANE, M. A. *et al.* Disintegrins. **Curr.Drug Targets.Cardiovasc.Haematol.Disord.**, v.4, n. 4, p. 327-355, 2004.
- MCLANE,M.A. *et al.* Scratching below the surface: wound healing and alanine mutagenesis provide unique insights into interactions between eristostatin, platelets and melanoma cells.**Pathophysiol.Haemost.Thromb.**,v.34,n.4-5,p.164-168, 2005.
- MENEZES, M.C. *et al* Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon**, v.47, p. 304-312, 2006.
- MENEZES,M.C. *et al.* Activation of leukocyte rolling by the cysteine-rich domain and the hyper-variable region of HF3, a snake venom hemorrhagic metalloproteinase. **FEBS Lett.**,v.582, p.3915-3921,2008.
- MERCURIO, A.M. *et al.*Autocrine signaling in carcinoma: VEGF and the $\alpha 6\beta 4$ integrin.**Semin. Cancer Biol.**, v.14, p.115-122, 2004.
- MIERKE, C.T. *et al.* Breakdown of the Endothelial Barrier Function in Tumor Cell Transmigration. **Biophys. J.**,v.94, p.2832-2846, 2008.
- MILLARD, M.; ODDE, S.; NEAMATI,N. Integrin Targeted Therapeutics.**Theranostics.**v.1,p.154-188,2011.
- MINEA, R., SWENSON, S., COSTA, F., CHEN, T.C. Development of a novel recombinant Disintegrin contortrostatin, as an effective anti-tumor and anti-angiogenic agent. **Pathophysiol. Haemost. Thromb.** v.34, p.177-183, 2005.
- MINEA,R.O *et al.* Vicrostatin-An Anti-Invasive Multi-Integrin Targeting Chimeric Disintegrin with Tumor Anti-Angiogenic and Pro-Apoptotic Activities. **PLoS ONE**, v.6, n.6, p1-20, 2010.
- MONTENEGRO,C.F. *et al.* Blocking $\alpha v\beta 3$ Integrin by RGD Disintegrin Impairs VEGF Signaling in Endothelial cells and Inhibits tumor cell migration. Dados não publicados, 2011.
- ÖHLER, M. *et al.* The venomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. **J. Proteome Res.** v. 9, p. 2422-2437, 2010.

OVERALL,C.M; LÓPEZ-OTÍN, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. **Nat. Rev. Cancer**, v.2, 657-672, 2002.

POLANOWSKA-GRABOWSKA, R.; GIBBINS, J.M.; GEAR,A.R.L. Platelet Adhesion to Collagen and Collagen-Related Peptide Under Flow_Roles of the $\alpha 2\beta 1$ Integrin, GPVI, and SRC Tyrosine Kinases. **Arterioscler.Thromb.Vasc.**,v.23,p.1934-1940, 2003.

PSAILA, B.,KAPLAN, R.N., PORT, E., LYDEN,D. Priming the “Soil” for Breast Cancer Metastasis: The Pre-Metastatic Niche. **Breast Disease**,v26, p.65-74, 2007.

RAMOS, O.H.P. Desintegrinas de *Bothrops alternatus*: Biologia Molecular,Estudos in vitro, in vivo e Bioinformática estrutural. **Tese de doutorado**, Universidade Federal de São Carlos, 2005.

RAMOS, O.H.P., SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Snake venom metalloproteases_ struture and function of catalitic and Disintegrin domains. **Comp. Bioch. and Phys.**, v. 142, p. 328-346, 2006.

RAMOS, O. H. P. *et al.* Modulation of in vitro and in vivo angiogenesis by alternagin-C, a disintegrin-like protein from *Bothrops alternatus* snake venom and by a peptide derived from its sequence. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 461, p. 1-6, 2007.

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,p53-64, 2008.

RIA,R. *et al.* Angiogenesis and Progression in Human Melanoma.**Dermatol.Res. Pract.**, v.2010, p1-6, 2010.

ROCHA,M.M.T; FURTADO,M.F.D.Characterização Individual do veneno de *Bothrops alternatus*, Duméril,Bibron & Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil (Serpentes, Viperidae).**Rev. Brás. Zool.**, v.22, n.2, p.383-393, 2005.

ROSS,R.S. Molecular and mechanical synergy: cross-talk between integrins and growth factor receptors. **Cardiovasc. Res.**,v.63, p.381-390, 2004.

SÁNCHEZ,E.E. *et al.* Cloning, expression, and hemostatic activities of a disintegrin, r-mojastin 1 from the mohave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*). **Thromb. Res.**, v.126,p.e211-e219,2010.

SANTOS-MARTÍNEZ,M.J. *et al.* Role of metalloproteinases in platelet functions. **Thromb. Res.**, v.121,p.535-542,2007.

SCHMITMEIER,S. *et al.* Potent mimicry of fibronectin-induced Intracellular Signaling in Glioma Cells by the Homodimeric Snake Venom Disintegrin Contortrostatin. **Neurosurgery**,v.57,p.141-153,2005.

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

SERRANO, S.M. *et al.* The Cysteine-rich Domain of Snake Venom Metalloproteinases is a Ligand for von Willebrand factor A Domains. Role in Substrate Targeting. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p.39746-56, 2006.

SILVA, T.H.A. *et al.* Agentes anti-tumorais inibidores da angiogênese-Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha\beta 3$. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.43, n.1, p.1-17, 2007.

SOHN, Y-D. *et al.* Suppressive effect and mechanism of saxatilin, a disintegrin from Korean snake (*Gloydius saxatilis*), in vascular smooth muscle cells. **Toxicon**, v.52, p.474-480, 2008.

STANISZEWSKA, I. *et al.* Integrin $\alpha 9\beta 1$ is a receptor for nerve growth factor and other neurotrophins. **J. Cell. Sci.**, v.121, p.504-513, 2008.

STANISZEWSKA, I. *et al.* Effect of VP12 and viperistatin on inhibition of collagen receptors-dependent melanoma metastasis. **Cancer Biol. Ther.**, v.8, n.15, p.1507-1516, 2009.

STELLER-STEVENSON, W.G. The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. **Cancer Metastasis Rev.**, v.27, n.1, 2008.

STUELLEN, C.H. *et al.* Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF-alpha and TGF-beta. **J. Cell Sci.**, v.15, n. 118, p. 2143-53, 2005.

STUPACK, D. G.; PUENTE, X. S.; BOUTSABOUALOY, S.; STORGARD, C. M.; CHERESH, D. A. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. **J. Cell Biol.**, v. 155, p. 459-470, 2001.

SWENSON, S. *et al.* Intravenous liposomal delivery of the snake venom disintegrin contortrostatin limits breast cancer progression. **Mol. Cancer Ther.**, v.3, n.4, p.499-511, 2004.

TANJONI, I. *et al.* Different regions of the class P-III snake venom metalloproteinase jararhagin are involved in binding to $\alpha 2\beta 1$ integrin and collagen. **Toxicon**, v.55, n.6, p.1093-1099, 2010.

THIOLLOY, S. *et al.* Osteoclast derived matrix metalloproteinase-7 but not matrix metalloproteinase-9 contributes to tumor induced osteolysis. **Cancer Res.**, v.69, n.16, p.6747-6755, 2009.

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

ULRICH, F.; HEISENBERG, C-P. Trafficking and Cell Migration. **Traffic**, v.10, p.811-818, 2009.

vAN GOLEM, K.L. *et al.* Suppression of tumor Recurrence and Metastasis by a combination of the PHSCN Sequence and the Antiangiogenic Compound Tetrathiomolybdate in Prostate Carcinoma. **Neoplasia**, v.4, n.5, p.373-379, 2002.

VENENOUS REPTILES ORG. Disponível em: <<http://www.venomousreptiles.org>>. Acesso em 05/17/2011.

WIJEYEWICKREMA,L.C.; BERNDT,M.C.;ANDREWS R.K. Snake venom probes of platelet adhesion receptors and their ligands. **Toxicon**, v.45, p.1051-1061, 2005.

YAGI,H.; YOTSUMOTO, F.; MIYAMOTO, S. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor promotes transcoelomic metastasis in ovarian cancer through epithelial-mesenchymal transition. **Mol.Cancer Ther.**, v.7, p.3441-3451, 2008.

YANG, R-S., TANG, C-H., CHUANG, W-J., *et al* Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin. **Toxicon**, v.45,p.661-669, 2005.

YEH,C.H. *et al*. A new short chain RGD-containing dsintegrin, accutin, inhibits the common pathway of human platelet aggregation.**Biochim. Biophys. Acta**, v.1425, p.493-504, 1998.

YILMAZ, M.; CHRISTOFORI,G.; LEHEMBRE,F. Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis.**Trends Mol. Med.**,v.13, n.12, p.535-541, 2007.

YU, H.; MOUW,J.K.; WEAVER, V.M. Forcing form and function: biomechanical regulation of tumor evolution. **Trends Cell Biol.**, v.21,n.1, p.47-56, 2011. (VERIFICAR).

ZHANG, S. *et al*. Modulation of prostate cancer cell gene expression by cell-to-cell contact with bone marrow stromal cells or osteoblasts. **Clin.Exp.Metastasis**, v.26, p.993-1004, 2009.

ZHOU, Q. *et al*. Molecular cloning and functional expression of contortrostatin, a homodimeric disintegrin from southern copperhead snake venom. **Arch.Biochem.Biophys.**, v. 375, n. 2, p. 278-288, 2000.

ZHU,L. *et al*. Expression, purification and characterization of recombinant Jerdonitin, a P-II class snake venom metalloproteinase comprising metalloproteinase and disintegrin domains. **Toxicon**, v.55, p.375-380, 2010.

ZINGRINO,P;ROSWITHA,N;MAUCH,C. The Disintegrin-like and Cysteine-rich domains of ADAM-9 Mediate Interactions between Melanoma Cells and Fibroblasts. **J. Biol. Chem.**,v.285, n.8, p6801-6807, 2011.