

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

**“ESTUDO DO EFEITO DA ALTERNAGINA-C, UMA
DESINTEGRINA DO VENENO DE *Bothrops alternatus*,
SOBRE A ADESÃO DE CÉLULAS NORMAIS E TUMORAIS.
AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL COMO AGENTE ANTI-
METASTÁTICO”**

CRISTINA HELENA BRUNO TERRUGGI

SÃO CARLOS – SP
2004

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

**“ESTUDO DO EFEITO DA ALTERNAGINA-C, UMA
DESINTEGRINA DO VENENO DE *Bothrops alternatus*,
SOBRE A ADESÃO DE CÉLULAS NORMAIS E TUMORAIS.
AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL COMO AGENTE ANTI-
METASTÁTICO”**

CRISTINA HELENA BRUNO TERRUGGI

**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 Biológicas.**

**SÃO CARLOS – SP
2004**

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

T328ee

Terruggi, Cristina Helena Bruno.

Estudo do efeito da Alternagina-C, uma desintegrina do veneno de *Bothrops alternatus*, sobre a adesão de células normais e tumorais. Avaliação do seu potencial como agente anti-metastático / Cristina Helena Bruno Terruggi. -- São Carlos : UFSCar, 2005.

151 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Veneno de serpente. 2. Desintegrina. 3. Câncer – drogas terapêuticas. 4. Células - adesão. I. Título.

CDD: 615.942 (20^a)

Orientadora:

Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo

*Para as pessoas que inventaram
as suas próprias leis
quando sabem ter razão;
para as que têm um prazer especial
em fazer coisas bem feitas,
nem que seja só para elas;
para as que sabem que a vida
é algo mais do aquilo
que os nossos olhos vêem...*

*Dedico este trabalho ao meu marido Luís Fernando e aos meus filhos Paola, Marcella e Leonardo, pela compreensão, cooperação, amor, respeito e admiração;
Aos meus pais Ronaldo e Maria de Lourdes que, com amor, sempre me apoiaram para que eu seguisse em frente;
Aos meus irmãos Ronaldo e Rogério, pelo amor, apoio e conselhos oportunos...
Vocês são a minha vida, eu tenho sorte...
Eu amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

Por um momento eu cheguei a pensar que finalizar uma tese era algo impossível, surreal. Enfim, chegou a minha vez, e, sem a ajuda de muitos, e, acima de tudo de DEUS, certamente eu não estaria aqui agora...

Quero agradecer à minha grande amiga Profa. Dra. Ana Tereza Lombardi, da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pelas recomendações e dicas valiosas que me fizeram chegar à Universidade federal de São Carlos – UFSCar.

Agradeço os meus amigos Maurício e Andréa pela amizade e companheirismo, à Anne Caroline, minha filha do coração e à Nali por seu carinho de irmã e apoio...

À Daniella Frisso Bittencourt pela amizade e força;

À Antonia, meu braço direito, que “pilota” minha casa e cuida com amor e carinho dos meus pequeninos quando estou ausente;

Quero agradecer à Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, minha orientadora, pois foi através da sua confiança e mãos que eu pude ingressar no curso de Doutorado. Agradeço-a também porque, apesar de não me conhecer, acolheu-me em seu laboratório, e, com paciência (e que paciência!), bom senso e extrema competência, proporcionou-me a aquisição de conhecimentos e informações necessárias para o meu amadurecimento científico. Além da excelente orientação profissional, nossos diálogos acabaram por extrapolar o âmbito profissional, o que pessoalmente, me enriqueceu bastante... Obrigada pela oportunidade...

Gostaria de agradecer, também, à Profa. Dra. Verônica Morandi e suas alunas da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ) pela acolhida em seu laboratório, onde eu pude aprender a manipular cultura de células primárias.

Agradeço, também, ao Prof. Dr. Michel Crépin (pela orientação e dedicação), à Madame Madeleine Berard e a toda equipe (alunos e funcionários) da unité 553 – INSERM, do Hôpital Saint Louis, Paris, França, por me receberem tão calorosamente durante a minha estadia na França. Lá, obtive ótimos resultados e me senti em casa...

Gostaria de agradecer aos meus colegas de laboratório: Carmen, Carol, Rita, Verzola, Mônica, Oscar (pelos “helps” no computador!), Renner, Ademar, André, Márcia e, em especial à Ana Flávia, Jú e Raquel, com quem compartilhei muitos bons momentos...

À Beth, pelo auxílio técnico e pelo bom humor de sempre.

Às funcionárias da seção de Pós-Graduação em Genética e Evolução, Rose, Tati e Regiane por me ajudarem sempre e por “quebrarem os meus galhos de última hora...”.

Às funcionárias da secretaria do departamento de Ciências Fisiológicas, Carmen e Tiani;

À FAPESP, pelo apoio financeiro e, enfim, a todos que me auxiliaram direta ou indiretamente para que este trabalho pudesse ser finalizado com êxito.

Muito obrigada...

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADAM:** proteína multimodular que apresenta os domínios metalopeptidase e desintegrina-símile.
- ADAMT:** ADAM com domínio adicional que contém repetições do tipo 1 encontrado nas trombospondinas.
- ALT-C:** Alternagina-C.
- BMP-1:** proteína morfogenética óssea.
- BSA:** soro albumina bovina.
- Ca²⁺:** íon cálcio
- CAM:** molécula de adesão celular.
- CMFDA:** clorometil diacetato fluoresceína.
- DL₅₀:** dose letal para 50% dos animais experimentados.
- DMEM:** meio Dulbecco's modificado.
- DMEM/F12:** meio Dulbecco's modificado acrescido de nutrientes (aminoácidos não-essenciais).
- D/ECD:** seqüência adesiva formada por ácido aspártico/ácido glutâmico – cisteína – ácido aspártico.
- EDTA:** ácido etilenodiaminotetraacético.
- EGF:** Fator de crescimento epitelial.
- EGR-2:** fator de transcrição: resposta para crescimento tardio 2; família das Ets.
- EGR-3:** fator de transcrição: resposta para crescimento tardio 3; família das Ets.
- ELK-1:** fator de transcrição para proliferação celular.
- Erk:** quinase reguladora de sinais extracelulares.
- Erk-2:** quinase reguladora de sinais extracelulares-2.
- Ets:** família de fatores de transcrição; regula entre outros a transcrição de VEGF e as MMPs estromelisina-1 e colagenase-1.
- FAK:** quinase de adesão focal.
- FBS:** soro fetal bovino.

a-FGF/FGF-1: fator de crescimento de fibroblastos ácido.

b-FGF/FGF-2: fator de crescimento de fibroblastos básico.

FN: fibronectina.

Grb2-SOS: complexo sinalizador que ativa a proteína-G Ras através da estimulação da troca da Guanosina Difosfato pela Guanosina Trifosfato.

HUVEC: células endoteliais de veia de cordão umbilical humano.

IC₅₀: Concentração inibitória

KGD: lisina – glicina – ácido aspártico

KSR: quinase supressora de Ras.

IL-11: interleucina-11

LFA-1: integrina $\alpha_2\beta_1$

MAPK: proteína quinase ativadora de mitose.

MEC: matriz extracelular.

MEK: complexo MAPK/Erk quinase.

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difenil tetrazólio.

PAK: quinase ativada p21.

PBS: tampão salina fosfato.

PP2A: fosfatase 2A.

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaqueta.

Raf-1: serina/treonina quinase-1.

Ras: proteína oncogênica (rat sarcoma).

RNA: ácido ribonucléico.

RGD: seqüência adesiva formada por arginina – glicina – ácido aspártico.

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (dodecil sulfato de sódio).

ShC: proteína tirosina fosforilada pela FAK (proteína adaptadora).

STATs: proteínas transdutoras e ativadas de transcrição.

SVMP: metalopeptidases de venenos de serpentes.

TGF- β : Fator de crescimento transformante do tipo beta)

VEGF: fator de crescimento de endotélio de vaso.

VEGFR: receptor de fator de crescimento de endotélio de vaso.

VLA-2: receptor de laminina/ colágeno, integrina $\alpha_2\beta_1$.

VLA-3: receptor de colágeno, integrina $\alpha_3\beta_1$.

VLA-4: receptor de fibronectina, integrina $\alpha_4\beta_1$.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da organização dos órgãos das serpentes.....	24
Figura 2: Tipos de junções celulares existentes em vertebrados.....	33
Figura 3: Moléculas de adesão celular.....	35
Figura 4: Esquema proteínas da MEC e da superfície de membrana celular.....	40
Figura 5: Esquema das subunidades a e b da integrina e subgrupos.....	44
Figura 6: Via de sinalização Ras-Raf-MEK-ERK.....	59
Figura 7: Diagrama esquemático da estrutura das classes de metaloproteases de venenos de serpente.....	62
Figura 8: Análise do perfil cromatográfico da primeira passagem do veneno bruto de <i>B. alternatus</i>	86
Figura 9: Análise do perfil cromatográfico da passagem das frações referentes ao primeiro pico de eluição pela coluna de filtração em gel Superdex- 200.....	87
Figura 10: Análise do perfil eletroforético das frações obtidas na segunda etapa de purificação da ALT-C.....	88
Figura 11: Análise da imunodeteção da ALT-C por Western blotting. Frações referentes a ALT-C contra anticorpo anti-ALT-C.....	88
Figura 12: Análise do perfil cromatográfico da eluição do soro imune em coluna de afinidade Sepharose Proteína A.....	89
Figura 13: Efeito da ALT-C sobre a inibição da adesão das células NITH3T3 ao colágeno I.....	90
Figura 14: Efeito da ALT-C sobre a inibição da adesão das células ECV-304 ao colágeno	91
Figura 15: Efeito da ALT-C sobre a inibição da adesão das células HeLa ao colágeno.....	92
Figura 16: Efeito da ALT-C sobre a inibição da adesão das células MDA-MB-231 ao colágeno.....	93
Figura 17: Efeito da ALT-C sobre a inibição da adesão das células MCF-7 ao colágeno I.....	94

Figura 18: Efeito da ALT-C sobre a desadesão das células NITH3T3 ao colágeno I.....	96
Figura 19: Efeito da ALT-C sobre a desadesão das células ECV-304 ao colágeno tipo I.....	97
Figura 20: Efeito da ALT-C sobre a desadesão das células HeLa ao colágeno tipo I.....	98
Figura 21: Efeito da ALT-C sobre a desadesão das células K562- $\alpha_2\beta_1$ ao colágeno tipo I.	99
Figura 22: Curva de promoção da adesão das células NITH3T3-TK ao colágeno tipo I.....	100
Figura 23: Efeito da ALT-C sobre a promoção da adesão das células ECV-304 ao colágeno tipo I.....	101
Figura 24: Efeito da ALT-C sobre a promoção da adesão das células HeLa ao colágeno tipo I.....	102
Figura 25: Ensaio de citotoxicidade – linhagem NITH3T3.....	103
Figura 26: Efeito da ALT-C sobre a proliferação das células NITH3T3.....	106
Figura 27: Efeito da ALT-C sobre a proliferação das células ECV-304.....	107
Figura 28: Efeito da ALT-C sobre a proliferação das células HeLa.....	107
Figura 29: Efeito da ALT-C na migração das células MDA-MB-231.....	109
Figura 30: Efeito da ALT-C na migração das células MCF-7.....	109
Figura 31: Análise da expressão de MMPs.	111
Figura 32: Efeito dos peptídeos a e b sobre a inibição da adesão das células K562- $\alpha_2\beta_1$ ao colágeno tipo I.....	113
Figura 33: Efeito do peptídeo (a) sobre a inibição da adesão das células K562- $\alpha_2\beta_1$ ao colágeno tipo I	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Famílias de moléculas de adesão celular	39
Tabela 2: Subunidades de integrinas e seus ligantes	45
Tabela 3: linhagens celulares estudadas e suas características.....	73
Tabela 4: Efeitos da ALT-C sobre as diferentes linhagens celulares.....	115

LISTA DE FLUXOGRAMAS

- Fluxograma 1:** Diferenciação das serpentes peçonhentas e não peçonhentas....26
- Fluxograma 2:** Classificação das metaloendopeptidases.....49

RESUMO

A integrina- $\alpha_2\beta_1$ é o principal receptor do colágeno tipo I, o qual possui papel essencial na adesão de células normais e tumorais à matriz extracelular, bem como no desenvolvimento de metástases. Portanto, desintegrinas que inibem especificamente a ligação do colágeno com a integrina- $\alpha_2\beta_1$, são importantes ferramentas para o estudo do câncer metastático e para o desenvolvimento de derivados peptídicos inibidores de células tumorais invasivas (drogas antimetastáticas). Foram isoladas do veneno da serpente *Bothrops alternatus*, uma metalopeptidase (Alternagina) de 55 kDa e seu domínio processado, Alternagina-C (ALT-C) (30 kDa). A ALT-C tem no domínio desintegrina a sequência adesiva ECD ao invés da sequência RGD. Esta desintegrina-símile inibe a adesão mediada pelo colágeno tipo I de células transfectadas K562- $\alpha_2\beta_1$, e a inibição é dose dependente (IC_{50} = 100 nM). Assim, este projeto propôs (1) o estudo do efeito da ALT-C sobre células normais e tumorais através da realização de ensaios biológicos de adesão celular, migração e proliferação celulares, e (2) Ensaios biológicos com peptídeos sintéticos contendo a sequência adesiva ECD da ALT-C. A ALT-C inibiu a adesão das linhagens celulares NITH3T3, MDA-MB-231, HeLa, ECV-304 ao colágeno tipo I, com uma IC_{50} de 0,95; 1,38; 1,66 e 2,2 μ M respectivamente. Quando imobilizada em placas, a ALT-C promoveu a adesão das linhagens NITH3T3, HeLa e ECV-304. A ALT-C não foi capaz de desaderir linhagens NITH3T3, HeLa e ECV-304, estando estas previamente aderidas ao seu substrato. Em presença de colágeno tipo I, a ALT-C induziu a migração das células MDA-MB-231 e, em altas concentrações ela inibiu este efeito. A ALT-C não exerceu efeito inibitório ou indutor sobre a adesão ou a migração da linhagem celular dependente de estrógeno MCF-7, que expressa baixos níveis da integrina- $\alpha_2\beta_1$ quando comparada com as demais linhagens estudadas. Quanto aos peptídeos sintéticos testados, mesmo em concentrações mais elevadas não foram capazes de inibir a adesão das células K562- $\alpha_2\beta_1$ de forma significativa. A ALT-C, tanto na forma solúvel quanto na forma imobilizada ao plástico, induziu a proliferação celular em HUVECs e este efeito poderia estar relacionado com um aumento da expressão de fatores de crescimento. Em células da linhagem NITH3T3, a ALT-C na forma solúvel induziu de forma significativa a expressão de VEGF. A ALT-C também aumentou a expressão de outros fatores de crescimento, tais como IL-11, TGF β e EGR2 e 3, os quais provavelmente estão envolvidos no efeito positivo sobre a proliferação celular das HUVECs e outros tipos celulares. Diante destes resultados, podemos concluir que a ALT-C pode vir a ser uma potencial ferramenta terapêutica para modelos de estudo sobre o câncer e para o desenho de fármacos que atuem especificamente em linhagens celulares tumorais que expressem a integrina $\alpha_2\beta_1$, inibindo a adesão destas ao colágeno tipo I.

ABSTRACT

The $\alpha_2\beta_1$ integrin is a major collagen receptor that plays an essential role in the normal and tumor cells adhesion to the extracellular matrix, as well as in the metastasis. Antagonists of integrins have been developed in order to provide powerful therapeutic approaches for the several types of cancer and metastasis treatment. A metalloproteinase/disintegrin was isolated, which is a specific inhibitor of the collagen type I binding to $\alpha_2\beta_1$ integrin. This 55-kDa protein (Alternagin) and its disintegrin-like 30-kDa domain Alternagin-C (ALT-C) were isolated from the *Bothrops alternatus* – a brazilian snake - venom. This disintegrin-like domain has an additional cysteine-rich domain, which is not found in RGD-disintegrins, and the RGD motif is replaced by an ECD sequence. So, the purposes of the project were (1) Evaluate the effect of ALT-C on tumor and non-tumor cell adhesion, proliferation and migration, (2) To study the effects of ECD-motif derived peptides on tumor and non-tumor cell adhesion. ALT-C inhibited the adhesion of N1H3T3, human bladder ECV-304, human cervix HeLa and breast MDA-MB-231 cells to collagen type I (IC₅₀ of 2.2, 1.66, 1.38 and 0,95 μ M respectively). Besides, when immobilized on plate wells, ALT-C supported the adhesion of these cell lines. ALT-C did not detach cells which were previously bound to collagen type I. In the presence of collagen type I, ALT-C stimulates the migration of MDA-MB-231 cells and in greater concentrations it inhibits migration. ALT-C does not inhibit the adhesion and the migration of estrogen dependent MCF-7 cells. ALT-C also induces significant HUVEC proliferation in vivo, by up-regulating VEGF expression in human fibroblasts and endothelial cells. ALT-C also strongly activates Akt/PKB phosphorylation, a signaling event involved in endothelial survival and angiogenesis. In addition, related to the up-regulation of the VEGF's expression, ALT-C up-regulates other growth factors expression involved in cell proliferation, such as IL-11, TGF β , and EGR2 and 3, which are probably also involved on its positive effect on HUVEC proliferation. These biological activities of ALT-C can be useful in anti-cancer therapy experimental studies.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Origem das Serpentes	21
1.2 Morfologia das serpentes	24
1.3 Características e distribuição geográfica das serpentes brasileiras de importância médica	27
1.3.1 Família Viperidae	27
1.3.1.1 Gênero Bothrops	27
1.3.1.2 Gênero Crotalus	27
1.3.1.3 Gênero Lachesis	28
1.3.2 Família Elapidae	28
1.3.2.1 Gênero Micrurus	28
1.3.3 Família Colubridae	29
1.4 Acidentes ofídicos: distribuição, morbidade, mortalidade e letalidade	29
1.5 Estudo dos venenos de serpentes	30
2 ADESÃO CELULAR	32
2.1 Moléculas de adesão celular	36
2.1.1 Selectinas	36
2.1.2 Caderinas	36
2.1.3 Superfamília das Imunoglobulinas	37
2.1.4 Adressinas	38
3 MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)	39
4 INTEGRINAS	43
5 METALOPEPTIDASES	49

5.1 Metalopeptidases da MEC (MMPs)	49
5.2 Metalopeptidases e desintegrinas de Mamíferos (ADAMs)	51
5.3 MMPs, ADAMs e fatores de crescimento	53
6 ANGIOGÊNESE	54
6.1 Sinalização mediada pelo VEGF e outros fatores de crescimento	58
6.2 FGF	59
7 METALOPEPTIDASES DE VENENOS DE SERPENTE (SVMPs)	60
8 DESINTEGRINAS	62
9 ALTERNAGINA E ALTERNAGINA-C (ALT-C)	65
10 OBJETIVOS	67
11 MATERIAIS E MÉTODOS	63
11.1 Obtenção do veneno bruto de <i>B. alternatus</i>	63
11.2 Obtenção dos animais.....	63
11.3 Purificação da ALT-C	63
11.4 Caracterização da ALT-C	63
11.5 Obtenção do soro imune Anti-ALT-C em coelho	64
11.5.1 Obtenção do soro pré-imune	64
11.5.2 Imunização do coelho (obtenção do soro imune)	64
11.5.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA)	65
11.5.4 Purificação parcial da fração γ -globulina do anti-soro Anti-ALT-C	66
11.5.4.1 Precipitação da γ -globulina em sç sat de sulfato de amônio pH 7,8.....	66
11.5.4.2 Cromatografia de afinidade em Sepharose Proteína A para separação de IgG.....	67
11.6 Ensaios de adesão	67

11.6.1 Linhagens celulares	67
11.6.2 Cultivo das células	68
11.6.3 Ensaio de inibição da adesão celular	69
11.6.3.1 Determinação da IC ₅₀ da ALT-C para as linhagens celulares	70
11.6.4 Ensaio de promoção da adesão celular	71
11.6.5 Ensaio de desadesão celular	72
11.6.6 Ensaio de proliferação celular	72
11.6.7 Ensaio de citotoxicidade da ALT-C para a linhagem celular NITH3T3	73
11.6.8 Ensaio de migração celular mediado pela ALT-C na presença e na ausência de colágeno tipo I	74
11.6.9 Zimografia para detecção da expressão de metalopeptidases (MMPs)	76
11.6.9.1 Análise da fração do extrato celular	76
11.6.9.2 Análise da fração protéica do meio de cultura condicionado	77
11.6.9.3 Confeção do gel, corrida e visualização das bandas	77
11.6.10 Ensaio de inibição da adesão celular mediada por peptídeos sintéticos.....	78
12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	79
13 RESULTADOS	79
13.6 Purificação da ALT-C	80
13.7 Obtenção do soro imune Anti-ALT-C em coelho	84
13.8 Ensaio de inibição da adesão celular mediado pela ALT-C.....	85
13.9 Ensaio de desadesão celular mediado pela ALT-C	89
13.10 Ensaio de promoção da adesão celular mediado pela ALT-C	94
13.11 Ensaio de citotoxicidade	97
13.12 Ensaio de proliferação celular mediado pela ALT-C	100
13.13 Zimografia para detecção da expressão de MMPs em células NITH3T3 tratadas com ALT-C.....	105

13.14 Ensaio de inibição da adesão das células K562- $\alpha_2\beta_1$ ao Colágeno tipo I, mediado pelos peptídeos sintéticos <i>a</i> e <i>b</i>	108
14 DISCUSSÃO.....	116
15 CONCLUSÃO	125
16 PERSPECTIVAS	126
17 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

1. INTRODUÇÃO

1.1. Origem das serpentes

O mundo das serpentes é fascinante, misterioso, podendo despertar tanto a admiração quanto a repulsa na mesma intensidade... Além disso, é um mundo cercado de mistificações; muitas são as lendas criadas, algumas delas absurdas como aqueles velhos contos que falam das serpentes que hipnotizam pessoas ou daquelas que dançam ao som das flautas!

Às serpentes já foram atribuídas diversas designações: poder de renovação relacionado com a habilidade de trocar a pele, os povos antigos as consideravam fonte de pecado e de todos os temores. Apesar disso, há lugares onde a serpente é reverenciada, como na festa da Serpente, em uma região da Itália.

Dentro da Alquimia a serpente era o símbolo da pedra filosofal, que se refere ao infinito.

Até hoje o ouroboros, a serpente que come a si mesma, representa a sabedoria e o tempo. Já a serpente que mata e salva a vida, ícone da perpetuidade ancestral, é utilizada nos símbolos médicos e farmacêuticos.

O fato é que tanto a curiosidade quanto o medo das serpentes devem ser tão antigos quanto a própria história da humanidade. As serpentes são predadores como as águias, os tubarões e os leões. Porém, devido à ignorância popular, muitas são mortas sem motivo algum, quando na verdade, apenas um pequeno número de espécies pode ser nocivo aos humanos, e desse, pouquíssimas espécies realmente podem matar um homem.

A palavra serpente tem origem latina: *serpens* + *antis* (que se arrasta, rastejante).

Sabe-se que as serpentes surgiram há cerca de 100-150 milhões de anos no período Cretáceo Inferior, quando os dinossauros estavam em fase de extinção.

Há duas hipóteses sobre a origem das serpentes, sendo que uma baseia-se na semelhança estrutural e ecológica entre alguns fósseis como a *Dinilysia* (80 milhões de anos), com serpentes tais como a *Cylindrophis* (família *Aniliidae*), e a outra afirma que os Saurias (*Lacertília*), grupo de lagartos, deram origem às serpentes. Dentre as espécies mais primitivas e conhecidas destacou-se primeiramente a *Lapparenthphis defrennei*, animal de hábitos terrestres que viveu na região onde agora está localizado o norte da África, há 100-150 milhões de anos atrás. Em segundo lugar está a serpente marinha *Simoliophis*, cujo fóssil data de 100 milhões de anos atrás e que foi encontrada em regiões da Europa e norte da África (CABRAL, 1999).

Recentemente, as hipóteses foram contestadas, após o descobrimento de um fóssil de 95 milhões de anos denominado *Haasiophis terra sanctus*, em Jerusalém (TCHERNOV et al., 2000). TCHERNOV et al demonstraram que este fóssil apresenta características ósseas de serpentes evoluídas, que a presença de membros posteriores não indica ancestralidade e que a perda dos membros nestes animais pode ter ocorrido várias vezes durante a evolução.

A *Haasiophis terra sanctus* é uma serpente de cerca de 70 centímetros, que foi identificada como tal através da avaliação da mobilidade do crânio (alta

mobilidade com articulação óssea diferente da dos lagartos), do número e formato das vértebras (do corpo, da região cloacal e da base caudal). A estrutura craniana revelou detalhes primitivos semelhantes ao da família *Aniliidae* (bem primitiva) e detalhes que se assemelham ao grupo dos macrostomatas (que podem abrir muito a boca para engolir animais inteiros). O crânio é tipicamente serpentiforme e o membro posterior é bem desenvolvido, com fêmur, tíbia, fíbula, tarso, metatarso e falange (TCHERNOV et al., 2000; CIÊNCIA HOJE, 2000 p.31).

Atualmente existem aproximadamente 3000 espécies distintas, sendo que a evolução e a propagação das serpentes vem ocorrendo com muito sucesso, pois diferentes espécies sobreviveram em diferentes tipos de habitat e climas, sendo as serpentes encontradas em quase todas as partes do planeta. No Brasil já foram catalogadas cerca de 260 espécies. Em decorrência dessa diversidade, as serpentes brasileiras tornaram-se animais desejados por laboratórios internacionais.

1.2. Morfologia das serpentes

As serpentes possuem o corpo alongado, com seus órgãos acompanhando o formato do corpo (Figura 1).

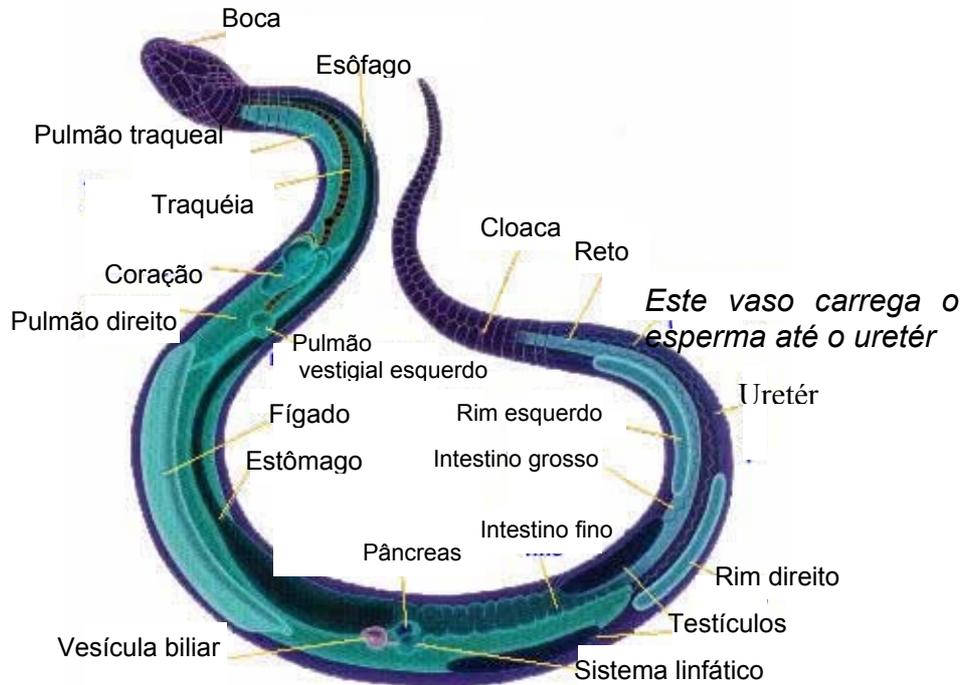


Figura 1 – Esquema da organização dos órgãos das serpentes.

Disponível em: <http://www.butantan.gov.br> . Acesso: 04 out. 2004.

As serpentes são desprovidas de membros, cavidade do ouvido médio e tímpano, ouvido externo, pálpebras móveis, esterno e bexiga urinária. Possui rins, fígado coração e pulmões. A grande maioria das serpentes, cerca de 90%, apresentam somente um pulmão, uma característica dos grupos mais avançados.

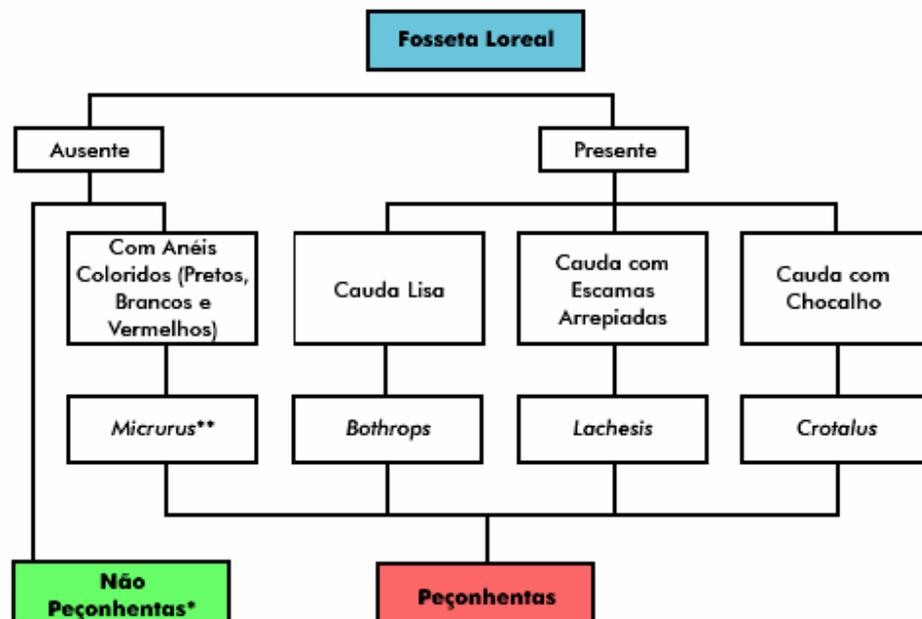
O corpo é recoberto por escamas epidérmicas córneas, que são importantes na identificação e classificação das serpentes. As escamas da cabeça podem ser bastante numerosas e pequenas, parecidas com as do dorso, como as da família *Viperidae*, que são peçonhentas; ou escamas lisas e grandes em forma de escudos ou placas cefálicas, como as da família *Colubridae*, não peçonhentas.

Na parte ventral apresentam-se escamas grandes dispostas da cabeça até a ponta da cauda, mas em cobras cegas e marinhas estas apresentam-se pequenas, podendo ser também lisas, carenadas ou ainda peroladas. O número de escamas ventrais nas serpentes corresponde aproximadamente ao número de vértebras. Na parte inferior da cauda as escamas passam a ser chamadas de caudais ou semicaudais e podem ser inteiras ou divididas. A função das escamas é evitar a perda de água pela pele e diminuir o desgaste causado pelo atrito no substrato. Os músculos são numerosos e bastante fortes, principalmente nas serpentes constritoras como as jibóias, salamantas e sucuris. A tolerância térmica vai de 0 a 47 graus, mas a temperatura ideal é de 25 graus, sendo que temperaturas muito discrepantes comprometem o metabolismo. As serpentes, como os demais répteis são peilotérmicos, ou seja, a sua temperatura varia de acordo com a do ambiente (Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, FUNASA, 2001).

Um dos mais apurados sentidos das serpentes está localizado na língua, que recolhe do ar partículas que são levadas a um órgão interno, sensível ao calor, permitindo à serpente perceber a presença ou a aproximação de outros animais, orientando suas atitudes de defesa ou ataque (Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, FUNASA, 2001).

As serpentes podem ser classificadas em dois grupos básicos: as peçonhentas, que são aquelas que conseguem inocular seu veneno no corpo de uma presa ou vítima, e as não peçonhentas, ambas encontradas no Brasil, nos mais diferentes tipos de habitat, inclusive em ambientes urbanos.

A Fosseta Loreal é uma membrana rica em terminações nervosas ligadas ao cérebro, funcionando como um órgão termo sensorial, permitindo a percepção de variações mínimas de temperatura da ordem de 0,003°C, num raio de cinco metros. (Fluxograma 1).



Fluxograma 1: Diferenciação das serpentes peçonhentas e não peçonhentas.

*As falsas corais podem apresentar o mesmo padrão de coloração das corais verdadeiras, sendo distinguidas pela ausência de dentes inoculadores.

** Na Amazônia ocorrem outras corais verdadeiras desprovidas de anéis vermelhos. Extraído de: MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Brasília, 2001. 112p.

1.3. Características e distribuição geográfica das serpentes brasileiras de importância médica

1.3.1. Família Viperidae

a) Gênero *Bothrops* (incluindo *Bothriopsis* e *Porthidium*)

Dentro deste gênero podemos encontrar aproximadamente 30 espécies, distribuídas por todo o Brasil. São conhecidas popularmente como jararaca, ouricana, jararacuçu, urutu-cruzeira, jararaca-do-rabo-branco, malhade-sapo, patrona, surucucurana, combóia, caiçara, e outras denominações. Estas serpentes habitam zonas rurais e periferias de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde tenha facilidade para proliferação de roedores (paióis, celeiros, depósitos de lenha). Têm hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares. Sentindo-se ameaçadas, podem apresentar comportamento agressivo, desferindo botes sem produzir ruídos (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – FUNASA, 1998).

b) Gênero *Crotalus*

Este gênero agrupa várias subespécies, pertencentes à espécie *Crotalus durissus*. São mais conhecidas como cascavel, cascavel-quatro-ventas, boicininga, maracambóia, maracá e outras denominações populares. Podemos encontrar estas espécies em campos abertos, áreas secas, arenosas e pedregosas e raramente na faixa litorânea. Não são agressivas, mas quando excitadas, denunciam sua presença pelo ruído característico do guizo ou chocalho (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – FUNASA, 1998).

c) Gênero *Lachesis*

Compreende a espécie *Lachesis muta* com duas subespécies. São conhecidas por: surucucu, surucucu-pico-de-jaca, surucutinga, malha-de-fogo. A surucucu é a maior das serpentes peçonhentas das Américas, atingindo até 3,5m. Habitam áreas florestais como Amazônia, Mata Atlântica e matas úmidas do Nordeste (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – FUNASA, 1998).

1.3.2. Família *Elapidae*

a) Gênero *Micrurus*

O gênero *Micrurus* compreende 18 espécies, distribuídas por todo o Brasil. São animais de pequeno e médio porte com tamanho de até 1 metro. São também conhecidas como coral, coral verdadeira ou boicorá. Apresentam anéis vermelhos, pretos e brancos em qualquer tipo de combinação. Na Região Amazônica e áreas limítrofes, são encontradas corais de cor marrom-escura (quase negra), com manchas avermelhadas na região ventral.

Em todo o Brasil, existem serpentes não peçonhentas com o mesmo padrão de coloração das corais verdadeiras, porém desprovidas de dentes inoculadores. Diferem ainda na configuração dos anéis que, em alguns casos, não envolvem toda a circunferência do corpo. São as chamadas falsas-corais (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – FUNASA, 1998).

1.3.3. Família Colubridae

Algumas espécies do gênero *Philodryas* (*P. olfersii*, *P. viridissimus* e *P. patagoniensis*) e *Clelia* (*C. clelia plumbea*) têm interesse médico, pois há relatos de quadro clínico de envenenamento. São conhecidas popularmente por cobra-cipó ou cobra-verde (*Philodryas*) e muçurana ou cobra-preta (*Clelia*).

Possuem dentes inoculadores na porção posterior da boca e não apresentam Fosseta Loreal. Para injetar o veneno, mordem e se prendem ao local (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – FUNASA, 1998).

1.4. Acidentes ofídicos: distribuição, morbidade, mortalidade e letalidade.

No período de setembro a março é observado um aumento do número de acidentes ofídicos, sendo que a maioria das notificações é proveniente da região meridional do país (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – FUNASA, 1998). Cerca de 74% dos casos notificados são atribuídos às serpentes do gênero *Bothrops*, 7% ao gênero *Crotalus*, 1,5% ao gênero *Lachesis*, 3% devido às serpentes não peçonhentas e 0,5% provocados por *Micrurus*. Cerca de 70% dos pacientes são do sexo masculino e em 53% a faixa etária concentrou-se entre 15 e 49 anos (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – FUNASA, 1998). A frequência de ataques nas pernas/pé é de 70%, antebraço/mão de 13%, todos decorrentes da não utilização de equipamentos mínimos de proteção individual: botas, sapatos, calças e luvas. No Brasil são registrados anualmente 20.000

acidentes, com uma letalidade de 0,43%, sendo que o acidente crotálico tem a pior evolução. Os valores detectados para os diversos tipos de acidentes são assim distribuídos: Botrópico 0,31%, Crotálico 1,85%, Laquélico 0,95% e Elapídico 0,36%. Em cerca de 19% dos óbitos não são informados o gênero das serpentes envolvidas (GUIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA – FUNASA, 1998).

1.5. Estudo dos venenos de serpentes

Tanto os venenos de serpentes quanto o isolamento e a caracterização de seus componentes têm sido alvo de intensas pesquisas científicas. Estes contêm uma mistura complexa de proteínas (cerca de 90% do peso seco do veneno bruto), compostos orgânicos de baixa massa molecular e compostos inorgânicos com atividades biológicas diversas. A composição dos venenos varia de acordo com a idade do animal, da região geográfica e com a sua alimentação. O sistema vascular é o mais susceptível aos venenos viperídicos, devido à presença de várias enzimas (proteases) com complexa variação na especificidade pelo substrato. Entre os efeitos provocados por estas proteases encontram-se as atividades procoagulante (SELISTRE E GIGLIO, 1987), hemorrágica (SELISTRE et al., 1990a; JOHNSON E OWNBY), anticoagulante (SELISTRE et al., 1990b; fibrinolítica (GUAN et al., 1991), ativadora de plaquetas (SERRANO et al., 1995) e inibidora de agregação plaquetária (KINI E EVANS, 1991; FUJIMURA et al., 1995).

O veneno das famílias das Elapidae e Hydrophiidae é altamente neurotóxico, causando morte por bloqueio da transmissão neuromuscular,

enquanto que o veneno das famílias das Viperidae causa choque, coagulação, hemorragia sistêmica e local, edema e necrose (NIEWIAROWSKI et al., 1994). A DL₅₀ do veneno elapídico para camundongos chega a ser abaixo de 0,03mg/Kg de peso.

Dentre as substâncias presentes nos venenos destacam-se aquelas que possuem tanto efeitos tóxicos quanto efeitos terapêuticos, ou seja, são de interesse médico: acetilcolinesterase (inibem a transmissão nervosa tanto autônoma quanto involuntária, podendo levar à parada cardiorrespiratória), as fosfolipases (mio e neurotóxicas), as hialuronidases que aumentam a perfusão entre os tecidos, as ADPases que inibem a agregação plaquetária, compostos que afetam a hemostasia e aqueles que degradam as proteínas de matriz extracelular e membrana basal endotelial (BJARNASON E FOX, 1994; KAMIGUTI et al., 1996; MATSUI et al., 2000).

Com o intuito de exemplificar melhor a ação de certos compostos obtidos à partir do veneno de serpentes serão apresentadas a seguir algumas definições básicas sobre adesão celular, matrix extracelular, metalopeptidases e desintegrinas.

2. ADESÃO CELULAR

O termo adesão celular descreve todas as formas de comunicação celular que ocorrem devido ao contato direto entre células ou entre células e matriz

extracelular. A adesão seja de uma célula à outra ou de uma célula à matriz extracelular é fundamental para diversos processos biológicos tais como desenvolvimento, diferenciação, transdução de sinais, resposta imunológica, manutenção da estrutura tecidual, metástases tumorais e cicatrização de ferimentos (WAGNER E WYSS, 1994).

Muitos tecidos simples, incluindo a maior parte dos epitélios, são derivados de células precursoras cuja progênie são impedidas de escaparem por ligações à matriz extracelular a outras células ou a ambas. Porém, à medida que as células vão sendo acumuladas, ao invés de simplesmente permanecerem unidas e desorganizadas, vão formando uma arquitetura tecidual mantida ativamente por adesões seletivas que as células fazem e ajustam progressivamente. Assim, se as células de tecidos embrionários diferentes forem artificialmente misturadas, elas espontaneamente ordenam-se, tentando restaurar a disposição normal (PETRUZZELLI et al., 1999).

Tais adesões seletivas são muito mais importantes no desenvolvimento de tecidos de origem complexa, os quais envolvem migração celular, onde uma população de células invade outra, e combina-se com outros tipos celulares, formando uma estrutura ordenada. Para que esse processo ocorra, é necessário que haja mecanismos para direcionar as células ao destino final, como a secreção de compostos químicos solúveis que atraiam células migrantes ou a disposição de moléculas adesivas na matriz extracelular ou na superfície de células para conduzir as células migrantes pelas vias corretas. Uma vez que as células

migrantes cheguem ao seu destino, elas devem reconhecer e associar-se às outras células semelhantes para formar o tecido (HYNES, 1999).

A adesão celular ocorre através das junções celulares, classificadas em (1) junções “oclusivas”, que “selam” as células unidas impedindo que moléculas pequenas passem do meio intra para o meio extracelular e vice-versa; (2) junções ancoradoras que conectam mecanicamente uma célula a outra ou a matriz extracelular através do citoesqueleto e (3) junções comunicantes que mediam a passagem de sinais químicos e elétricos entre as células e a matriz extracelular (Figura 2).

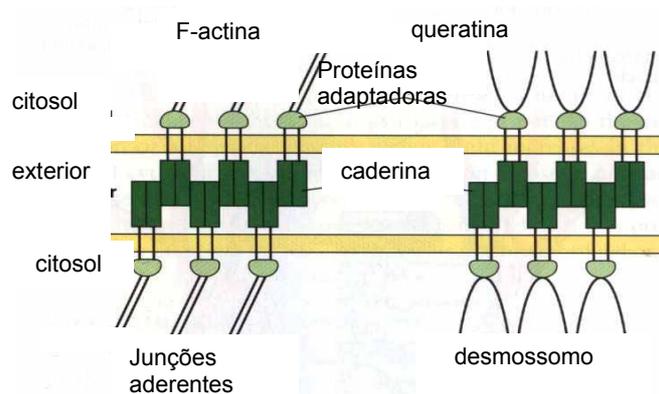


Figura 2: Tipos de junções celulares existentes em vertebrados.

Extraído de: www.sci.sdsu.edu/.../Exam_keys/Image5.jpg Acesso em: 13/10/2004.

Em vertebrados, as junções ancoradoras dividem-se em (1) sítios de ligação de filamentos de actina (junções aderentes célula-célula formando cinto de adesão, junções aderentes célula-matriz extracelular formando contatos focais) e

(2) sítios de ligação de filamentos intermediários (desmossomos – célula-célula e hemidesmossomos – célula-matriz extracelular) (SASTRY E BURRIDGE, 2000).

As junções ancoradoras são largamente distribuídas nos tecidos animais e são mais abundantes nos tecidos onde há uma maior tensão mecânica como o coração, músculo e epiderme. Elas são compostas por duas classes de proteínas: proteínas de ancoragem intracelular, que formam uma espécie de placa na face citoplasmática da membrana plasmática e conectam o complexo juncional aos filamentos de actina ou aos filamentos intermediários e as proteínas transmembranas de adesão, que possuem uma cauda citoplasmática que se liga a uma ou mais proteínas de adesão intracelular e um domínio extracelular que interage com outros domínios extracelulares de outras proteínas transmembranas específicas de outras células (SASTRY E BURRIDGE, 2000).

Além de ancorar proteínas e proteínas de adesão, as junções ancoradoras podem conter proteínas que sinalizam eventos intracelulares.

A base molecular da adesão celular foi identificada há mais de vinte anos atrás, e nessa época também foram descritas as primeiras moléculas envolvidas na adesão celular (WAGNER E WISS, 1994). Duas classes distintas de moléculas de adesão célula-célula (CAMs) operam na maioria dos animais multicelulares, uma dependente e outra independente de Ca^{2+} , e as moléculas dependentes de Ca^{2+} parecem ser primariamente responsáveis pela adesão celular que confere especificidade tecidual em estágios embrionários iniciais (WAGNER E WISS, 1994).

A estrutura primária da maioria das moléculas de adesão já foi determinada, sendo assim, é possível classificá-las em cinco diferentes grupos de famílias de moléculas de adesão ou receptores de adesão de superfície celular: selectinas (LASKY, 1992), caderinas (TAKEICHI, 1987), membros da superfamília de imunoglobulinas (Ig) (BRUMMENDORF E RATHJEN, 1995), adressinas (WAGNER E WISS, 1994) e as integrinas (HYNES, 1987) (Figura 3).

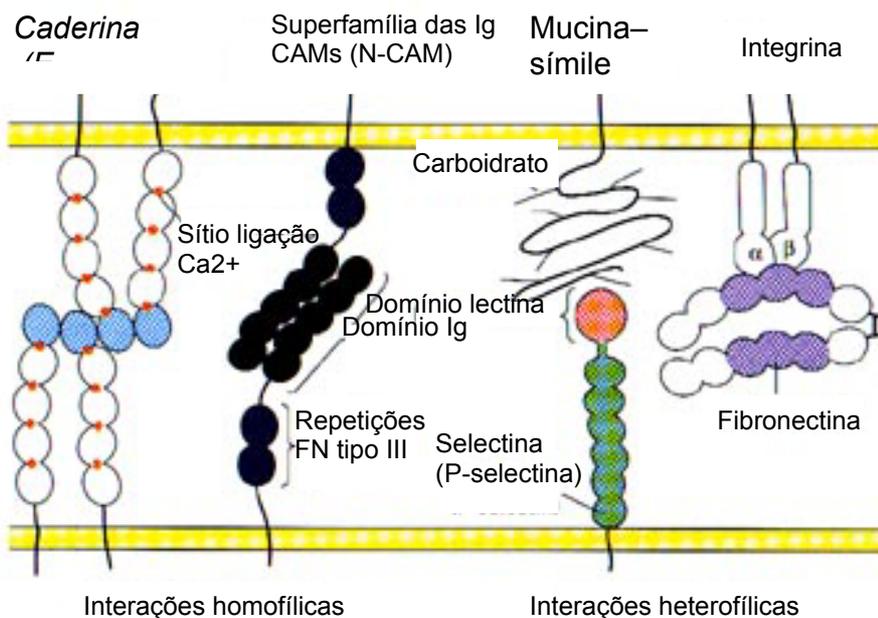


Figura 3: Moléculas de adesão celular. Extraído de: Sacco, P. et al. 1995.

As moléculas de adesão podem interagir de forma homofílica (interação entre duas moléculas de adesão iguais, ex. caderina-caderina) e/ou de forma

heterofílica (interação entre duas moléculas de adesão diferentes, ex. fibronectina-integrina).

2.1. Moléculas de Adesão Celular

2.1.1. Selectinas

As selectinas são uma família de glicoproteínas de superfície celular que possuem papel crucial na adesão célula-célula nos estágios iniciais dos processos inflamatórios (VESTWEBER E BLANKS, 1999). As selectinas mediam o contato entre células através da sua ligação a oligossacarídeos específicos presentes na superfície de outras células, ou pela sua ligação a outras glicoproteínas de superfície, incluindo selectinas. As selectinas são classificadas em L-, E- e P-selectinas, dependendo do local onde estão sendo expressas (leucócitos, células endoteliais e plaquetas, respectivamente).

Todas as selectinas são constituídas por um domínio N-terminal dependente de cálcio e responsável pelo reconhecimento de carboidratos na superfície das células, um domínio homólogo a primeira repetição do fator de crescimento epidermal (domínio EGF-símile) e um número variável de domínios similares ao domínio encontrado em proteínas regulatórias do complemento (LÖSTER E HORSTKORTE, 2000)

2.2.2. Caderinas

As caderinas são uma família de receptores de adesão que mediam a adesão entre células de maneira estritamente homofílica e cálcio-dependente. Cerca de 11 tipos de caderina já foram identificados em humanos. As primeiras caderinas que foram descobertas foram nomeadas de acordo com o tecido em que foram encontradas. Assim sendo, temos a E-caderina nas células epiteliais, a N-Caderina em neurônios, coração, músculo esquelético, cristalino e em fibroblastos, a P-caderina na placenta, epiderme e epitélio mamário e a VE-caderina em células endoteliais. As caderinas são glicoproteínas transmembranas, homodiméricas, formadas por 700-750 aminoácidos. A maior parte da cadeia polipeptídica é extracelular e composta de 5 domínios, cada qual com 100 aas, onde 4 destes domínios são homólogos e contêm sítios de ligação com cálcio (KOCH ET AL., 1999).

A E-caderina desempenha papel crucial no desenvolvimento, pois geralmente está concentrada nas junções aderentes em células epiteliais maduras, auxiliando na conexão com o citoesqueleto de actina

Na ausência de cálcio as caderinas sofrem alterações conformacionais e são degradadas por enzimas proteolíticas (KOCH ET AL., 1999).

2.2.3. Superfamília das Imunoglobulinas (Ig)

Os membros da superfamília das imunoglobulinas são compostos por um ou mais domínios imunoglobulina-símile, mediando a adesão homofílica entre células de maneira cálcio-independente, as quais são muito importantes durante as várias etapas iniciais da embriogênese e da regeneração. Entretanto, algumas proteínas de adesão Ig-símile utilizam mecanismo de adesão heterofílico. Um dos exemplos mais bem estudados é a molécula de adesão celular neural N-CAM, que é expressa por uma grande variedade de tipos celulares, incluindo algumas células nervosas. Há aproximadamente 20 formas de N-CAM, obtidas por splicing alternativo. Algumas formas de N-CAM carregam uma quantidade incomum de ácido siálico e devido a sua carga negativa, a presença desta cauda de ácido siálico está relacionada com a diminuição da adesão celular (WAGNER E WISS, 1994).

2.2.4. Adressinas

Estas glicoproteínas foram detectadas pela primeira vez em células endoteliais. São responsáveis pelo direcionamento dos linfócitos a órgãos específicos como os linfonodos. Elas podem estar relacionadas aos movimentos celulares. Sua estrutura ainda não foi resolvida (WAGNER E WISS, 1994).

A tabela a seguir ilustra as famílias de moléculas de adesão e suas características:

Tabela 1: Famílias de moléculas de adesão celular.

	Membros das famílias	Dependência de Ca²⁺ ou Mg²⁺	Homofílica ou Heterofílica	Associação com citoesqueleto	Junções Celulares
Adesão	Célula/	Célula			
Caderinas clássicas	E,N,P, VE.	Sim	Homofílica	Filamentos de actina	Junções aderentes
Caderinas desmossomais	Desmogleína	Sim	Homofílica	Filamentos intermediários	Desmossomos
Famílias das Ig	N-CAM	Não	Ambas	Desconhecido	Não
Selectinas	L-, E-, P-	Sim	Heterofílica	Filamentos de actina	Não
Integrinas (céls. Sangue)	α L β 2	Sim	Heterofílica	Filamentos de actina	Não
Adesão	Célula/	Matriz	Extracelular		
Integrinas	Vários tipos	Sim	Heterofílicas	Filamentos de actina	Adesão focal
	α 6 β 4	Sim	Heterofílica	Filamentos intermediários	Hemidesmossomos
Proteoglicanas transmembranas	Sindecanas	Não	Heterofílicas	Filamentos de actina	Não

Disponível em: <http://www.fasebj.org/cgi/content/full/12/13/1331/F5>. Acesso em: 30 set. 2004.

3. MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

Os tecidos não são formados apenas por células, sendo que uma grande parte do volume tecidual é formado pelo espaço extracelular, constituído por uma rede de macromoléculas, a matriz extracelular (MEC). Ela é composta por uma grande variedade de proteínas, polissacarídeos e fatores de crescimento que são secretados localmente e agrupados dentro de uma espécie de malha, estando em

contínua comunicação com a superfície das células, sendo que a organização da MEC é quem mantém a integridade estrutural dos tecidos (Figura 4).

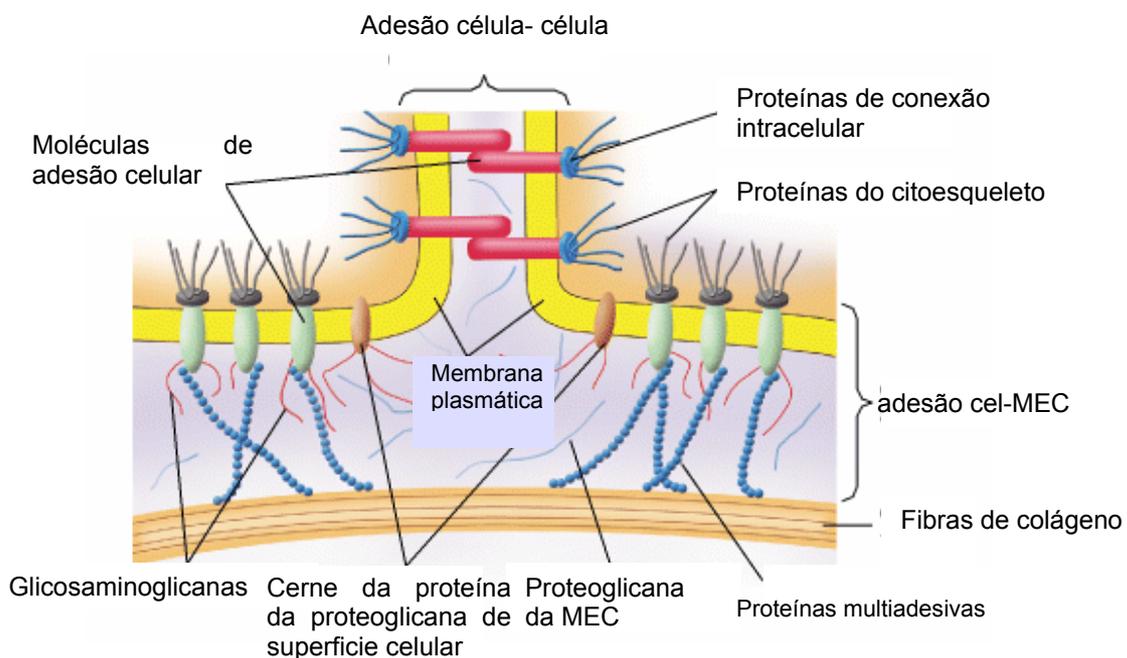


Figura 4: Esquema proteínas da MEC e da superfície de membrana celular.

Extraído de: www.sci.sdsu.edu/.../Exam_keys/Image5.jpg Acesso em: 13/10/2004.

Na maioria dos tecidos conectivos, as macromoléculas que constituem a MEC são produzidas e secretadas localmente pelos fibroblastos, que estão situados dentro da MEC. Estas células auxiliam na organização da MEC: a orientação do citoesqueleto dentro da célula pode controlar a orientação da produção dos componentes da MEC (GEIGER et al., 2000). Dentre estas

macromoléculas, destacam-se as glicosaminoglicanas (GAGs), as quais frequentemente são encontradas ligadas covalentemente a proteínas (proteoglicanas) e as proteínas fibrosas, incluindo o colágeno, elastina, fibronectina e laminina, que possuem as funções estruturais e adesivas.

No tecido conectivo, as moléculas de proteoglicanas formam uma espécie de gel altamente hidratado, embebendo as proteínas fibrosas. Este gel resiste às forças compressivas ao mesmo tempo em que permite a difusão de nutrientes, metabólitos e hormônios entre a circulação sanguínea e os tecidos celulares.

Existem variações entre as quantidades e a disposição dos diferentes tipos de macromoléculas da MEC, de acordo com o tecido circundado. Nos ossos e dentes podemos encontrar a MEC como uma estrutura mais rígida e calcificada, na córnea encontramos uma MEC transparente e, na interface entre o tecido conectivo e o epitélio podemos encontrar a lâmina basal, que está estreitamente relacionada à regulação do comportamento celular.

Todas as espécies que possuem tecidos conectivos têm uma MEC que produz enzimas que regulam continuamente o remodelamento tecidual em vários processos, tais como a embriogênese, morfogênese, desenvolvimento e em estados patológicos, através da degradação enzimática e síntese de componentes da MEC (VAN DEN STEEN et al., 2001). A expressão e ativação destas enzimas têm que ser estreitamente controlada para que a integridade do organismo possa ser mantida. A importância da checagem e do balanço pelos quais as enzimas são ativadas ou inibidas é demonstrada nas condições onde o controle destes mecanismos passa a não funcionar corretamente. Tais patologias incluem desde

as reações inflamatórias até a invasão de tecidos por células tumorais, as quais estão associadas com a degradação excessiva da MEC (CUZNER E OPDENAKKER, 1999). HAY (1995) mostrou que células mesenquimais derivadas de epitélio primitivo, por exemplo, requerem um remodelamento dentro da MEC para poderem atravessar o estroma e formarem tipos específicos de epitélio, indicando que a manutenção da diversidade celular é dependente do remodelamento da MEC (HAY, 1995). Estímulos biomecânicos também podem induzir o remodelamento da MEC em tecidos conectivos macios (STREULI, 1999; MANN et al., 2001). O remodelamento também é importante em numerosos processos diferenciativos na fase adulta, incluindo a neovascularização, a invasão de trofoblastos, alterações das glândulas mamárias e do tecido uterino (endométrio) durante o ciclo menstrual e a gestação (STREULI, 1999).

Da mesma maneira que ocorre com outras cascatas, tais como as dos sistemas complemento e da coagulação sanguínea, as enzimas que realizam o remodelamento da MEC são várias e atuam tanto em série como em paralelo. Dentre as enzimas responsáveis pelo remodelamento, seja ele fisiológico ou patológico estão a metalopeptidases da MEC (MMPs), a proteína morfogenética óssea (BMP1), as serinoproteases, as peptidases de membranas adamalinas-relacionadas de mamíferos que contêm domínios desintegrina e metalopeptidase (ADAMS) e, mais recentemente, as ADAMTS (desintegrina e metalopeptidase de mamíferos contendo um motivo adicional trombospondina-símile).

A maioria das enzimas da cascata de proteases também pode clivar proteoliticamente os componentes da MEC. Cada enzima pode atuar sobre vários

substratos da MEC, muitos dos quais específicos: plasmina cliva fibrina, enquanto que a colagenase intersticial (MMP-1) cliva colágenos nativos.

Durante todos estes processos, a transcrição gênica dos componentes da MEC e das enzimas responsáveis pelo remodelamento é regulada por fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, bem como pelas interações célula-célula (CUZNER E OPDENAKKER, 1999).

4. INTEGRINAS

O termo integrina foi proposto para designar receptores que integram o citoesqueleto celular e a matriz extracelular (HYNES, 1987).

As integrinas diferem de receptores de superfície celular para hormônios e outras moléculas sinalizadoras solúveis porque se ligam aos ligantes com baixa afinidade e normalmente estão presentes a uma concentração de 10 a 100 vezes maior na superfície da célula, o que permite que as células explorem o ambiente sem perder sua ligação à matriz. São receptores proteicos especialmente importantes porque são a via principal tanto para a ligação como para responder à matriz extracelular (HYNES, 1987).

As integrinas são proteínas transmembranas, heterodiméricas, formadas por duas subunidades glicoproteicas associadas por ligações não-covalentes: subunidade α (120 a 180 kDa) e subunidade β (90 a 110 kDa).

Atualmente são conhecidos 24 heterodímeros de integrina formados por 8 tipos de subunidades β e 18 tipos de subunidades α como mostra a figura 5. O “splicing” alternativo de alguns RNAs de integrinas aumentou esta diversidade. A integrina mais bem estudada é a glicoproteína IIb/IIIa (também conhecida como integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ ou CD41/CD61) de plaquetas, que reconhece a sequência RGD do fibrinogênio e está envolvida na agregação plaquetária. A cauda citoplasmática da integrina IIb/IIIa interage com o citoesqueleto da célula (WAGNER E WYSS, 1994).

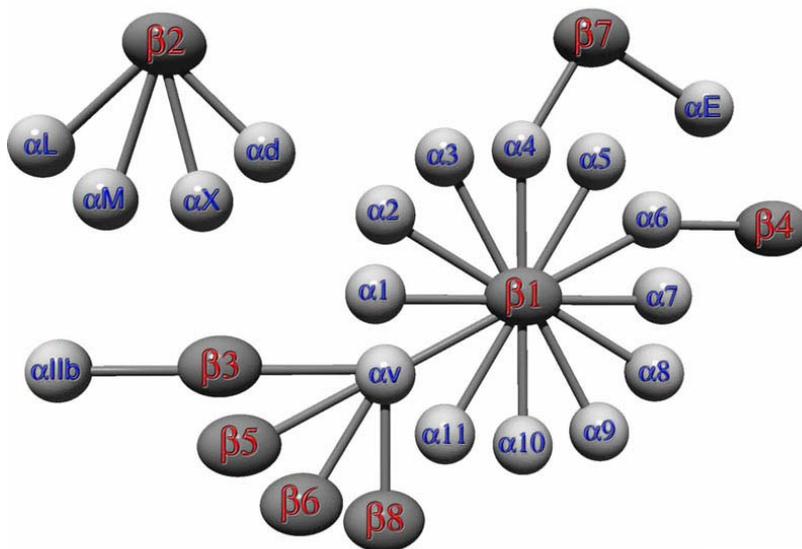


Figura 5: Esquema das subunidades α e β da integrina e subgrupos

Fonte: <http://members.lycos.nl/jkoster/wallpapers/itgfamgrey.jpg> Acesso em: 28/09/2004

As subunidades α possuem em seus domínios citoplasmáticos, sequências altamente conservadas (Gly-Phe-Phe-Lys-Arg) que estão relacionadas com a

transdução de sinais ou com a interação de suas duas subunidades (WAGNER E WYSS, 1994).

Algumas integrinas parecem ligar-se a apenas um tipo de proteína da matriz enquanto que outras ligam-se a mais de um tipo de proteína.

As integrinas são receptores de adesão celular cuja afinidade pelo ligante é modulada por sinais intra e extracelulares. As integrinas são divididas em vários subgrupos, cujos componentes apresentam certas características fisiológicas semelhantes. Cada subgrupo possui ligantes e localização específicos, como mostra a tabela a seguir:

Tabela 2: Subunidades de integrinas e seus ligantes.

Subunidade β	Subunidade α	Ligante
β_1	α_1	Lm, Col
	α_2	Col, Lm, $\alpha_3\beta_1$
	α_3	Fn, Lm, Col, Epi, Ent, $\alpha_2\beta_1$
	α_4	Fn (EILDV), VCAM α_4
	α_5	Fn (RGDS)
	α_6	Lm, Ka, Epi
	α_7	Lm
	α_8	Osteopontin
	α_9	Lm, Tem, VCAM-1
	α_V	Fn, Vn
β_2 (CD18)	α_L (LFA, CD11a)	ICAM
	α_M (MacI, CD11b)	IC3b, Fb, FX
	α_X (p150, 95, CD11c)	IC3b
β_3 (GPIIIa)	α_{IIb} (GPIIb)	Fb, VWF, Fn, Vn, TSP
	α_V (VNR)	Vn, VWF, Fn, Fg, Ost, TSP, Te
β_4	α_6	Lm, Ka
β_5	α_V	Vn

β_6	α_V	Fn
β_7 (Bp)	α_4	Fn (EILDV), VCAM
	α_E	Caderina
β_8	α_V	Vn

Abreviações: Lm – Laminina; Col – Colágeno; Vn – Vitronctina; Fb – Fibrinogênio; VWF – Fator Von Willebrand; FX – Fator X; ICAM – Molécula de Adesão Intracelular, células endoteliais; VCAM – Molécula de Adesão Vascular; Ka – Kalanin; Epi – Epigrilin, Ent – Enctatin; Ost – Osteopontin; Te – tenascin; RGDS – Arg-Gly-Asp-Ser; EILDV – Glu-Ile-Leu-Asp-Val; iC3b – sistema complemento. (Extraída de PETRUZZELLI *et al.*, 1999)

Muitas proteínas da matriz de vertebrados são reconhecidas por várias integrinas: pelo menos 8 integrinas se ligam à fibronectina e pelo menos 5 ligam-se à laminina. As cadeias β_1 , que formam dímeros com no mínimo 9 tipos cadeias α diferentes, são encontradas em quase todas as células de vertebrados; $\alpha_5\beta_1$ é o receptor para fibronectina, e $\alpha_6\beta_1$ é o receptor para laminina em vários tipos celulares. As cadeias β_2 , que formam dímeros com três tipos de cadeia α , são expressas exclusivamente na superfície das células brancas do sangue, e têm função essencial no recrutamento destas células nos processos inflamatórios e infecciosos. Uma destas integrinas, a $\alpha_L\beta_2$, é também chamada de LFA-1 e a outra, a integrina $\alpha_M\beta_2$ é chamada Mac-1, porque é encontrada principalmente em macrófagos. As integrinas β_2 mediam principalmente interações célula-célula, pela interação com ligantes específicos na outra célula, como as células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos. As moléculas de adesão da superfamília das moléculas de imunoglobulinas de adesão celular também podem ligar-se as integrinas através das ligações heterofílicas. As integrinas β_3 são encontradas em várias células, incluindo as plaquetas do sangue e células da linhagem dos megacarioblastóides (PHILLIPS *et al.*, 1991). Estas moléculas possuem um papel

decisivo na ativação das plaquetas (SHATILL *et al.*, 1998). A integrina $\alpha_v\beta_3$ é encontrada principalmente nas células endoteliais dos vasos sanguíneos e participa ativamente da angiogênese. Experimentos demonstraram que esta integrina aparenta ter grande importância na manutenção da sobrevivência de algumas células. Antagonistas de integrinas têm sido pesquisados e desenvolvidos no intuito de se encontrar ferramentas terapêuticas para o combate ao câncer e outras doenças, tais como os anticorpos anti-subunidade- α_v (MITJANS *et al.*, 1995). Diversas desintegrinas de venenos têm sido descritas como inibidoras de adesão de células cancerosas, migração, crescimento tumoral e desenvolvimento de metástases em modelos animais (KNUDSEN *et al.*, 1988; SHEU *et al.*, 1992). A maioria das desintegrinas estudada possui a sequência RGD, sendo, portanto, derivadas de metaloproteases da classe P-II (HUANG & NIEWIAROWSKI, 1994). A eristostatina e albolabrina inibem a adesão de células de melanoma a componentes da matriz extracelular, tais como fibronectina, laminina e vitronectina (SOZKA *et al.*, 1991). A echistatina, uma desintegrina-RGD isolada do veneno da serpente *Echis carinatus*, induz a desadesão de células previamente aderidas à fibronectina, promovendo uma regulação negativa da fosforilação dependente da FAK (Staiano *et al.*, 1997).

A contortostatina, uma desintegrina dimérica isolada do veneno de *Agkistrodon contortrix contortrix*, inibe a adesão de células tumorais à fibronectina, vitronectina, colágeno tipo I, a indução de metástase de células de melanoma em camundongos (Tripathi *et al.*, 1994) e inibe a angiogênese *in vivo* (MYLES *et al.*,

1994). Ela também se liga às integrina $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$, inibindo a migração de células tumorais e angiogênese (Zhou *et al.*, 2000), diminuindo significativamente o número de metástases pulmonares em animais injetados com células de melanoma (BEVIGLIA *et al.*, 1995). Também induz a fosforilação de várias proteínas envolvidas na via de sinalização mediada por integrinas (Ritter & Markland, 2001). A salmosina, proteína isolada do veneno da serpente *Agkistrodon halys brevicaudus*, inibiu a adesão de células de melanoma à proteínas da matriz extracelular, migração em matrigel e proliferação (Kang *et al.*, 1999). A jararagina, uma desintegrina-ECD isolada do veneno de *Bothrops jararaca*, inibiu a adesão de plaquetas ao colágeno (Kamiguti *et al.*, 1991), embora tenha sido demonstrado a ação proteolítica da jararagina sobre a integrina $\alpha_2\beta_1$. A jararagina também inibiu a adesão e migração de células tumorais, diminuindo o número de metástases in vivo (Correa Jr. *et al.*, 2002).

Com o bloqueio da integrina $\alpha_v\beta_3$ com anticorpos ou peptídeos, houve a inibição da angiogênese através da indução da apoptose de células angiogênicas proliferativas. Antagonistas de outras integrinas não produzem o mesmo resultado e a especificidade depende da natureza do estímulo angiogênico. (MEREDITH E SCHWARTZ, 1997).

Já foi evidenciado que durante a progressão tumoral há uma alteração no padrão de expressão da integrina $\alpha_3\beta_1$. Isto foi observado quando a expressão desta integrina em melanomas primários era baixa, ao passo que em melanomas metastáticos o nível de expressão subiu muito (MORINI *et al.*, 2000). A expressão

desta integrina também foi alterada em células metastáticas de carcinoma mamário. Também foi encontrada uma correlação entre a presença desta integrina e da integrina- $\alpha_2\beta_1$. e a habilidade de diferentes tipos de células tumorais aderirem ao osso cortical para metastatizá-lo (LUNDSTRÖM et al., 1998).

Durante a cicatrização de ferimentos HEINO (2000) mostrou que a expressão da integrina- $\alpha_1\beta_1$. em fibroblastos era diminuída, enquanto que a expressão da integrina- $\alpha_2\beta_1$ era sensivelmente aumentada. Isto é devido à ação de fatores de crescimento tais como o TGF- β (Fator de crescimento transformante do tipo beta) e PDGF (Fator de crescimento derivado de plaqueta). Esta integrina estaria relacionada com a cicatrização e formação de fibrose tecidual, juntamente com o colágeno. IVASKA E HEINO (2000) também mostraram que a regulação da produção de MMPs pelas integrinas é muito importante na migração célula, na cicatrização tecidual e na invasão dos tecidos por células tumorais.

A integrina- $\alpha_2\beta_1$ também está relacionada com o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares para o local de inflamação através da ligação com o colágeno. A comprovação foi obtida através de experimento onde a locomoção de leucócito polimorfonuclear pode ser inibida *in vitro* e *in vivo* pelo bloqueio desta integrina com anticorpo anti-subunidade- α_2 (WERR et al., 2000). Outro fato que confirmou este resultado é que esta integrina não é detectada na superfície de leucócitos polimorfonucleares circulantes no sangue, sendo somente detectada quando estes extravazam para dentro da pele ou cavidade peritoneal (WERR et al., 2000).

SENGER et al. (2002) sugeriram que o VEGF possa induzir a expressão das integrinas $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_1$ pelas células endoteliais da microcirculação, indicando que estas integrinas são importantes para o mecanismo pelo qual o VEGF promove a angiogênese.

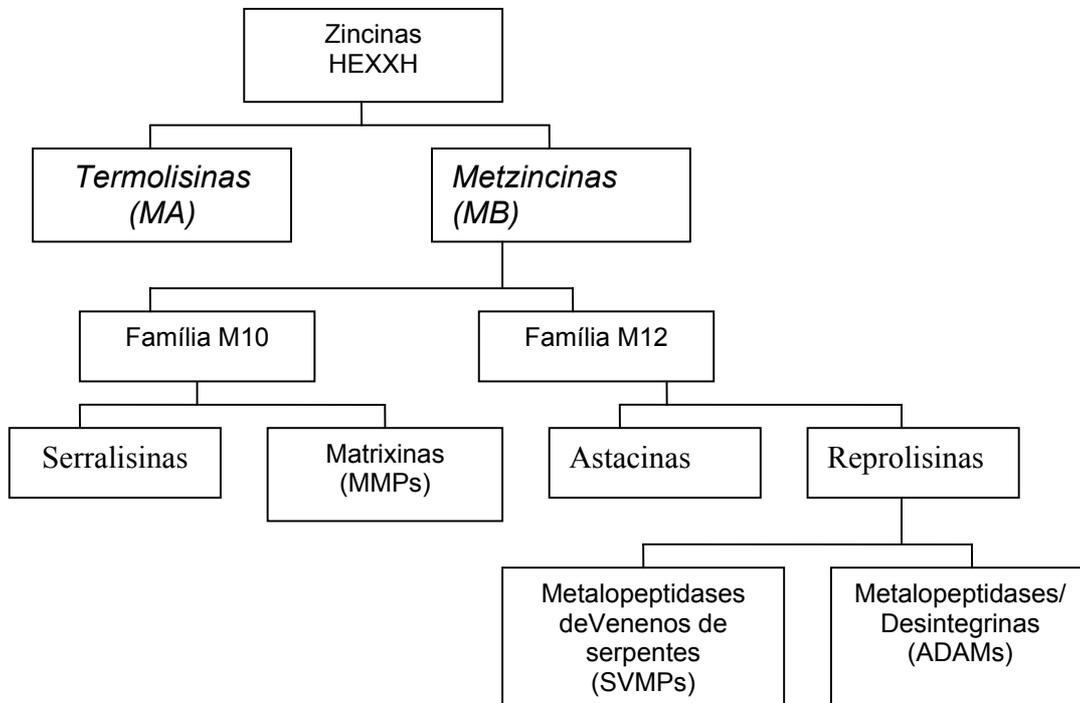
As moléculas da superfície celular, que são as moléculas de adesão intracelular (ICAM-1 e ICAM-2), as moléculas de adesão da mucosa (MadCAM-1), as moléculas de adesão celular vascular (VCAM-1) e as proteínas contidas na matriz extracelular (vitronectina, fibrinogênio, fibronectina e o iC3b do sistema complemento) são os ligantes preferenciais da integrinas (SPRINGER, 1990; 1994).

Algumas integrinas também estão envolvidas na modulação da secreção de MMPs durante a progressão tumoral (CHINTALA et al., 1996). As MMPs, ao lado das integrinas e dos fatores de crescimento, desempenham um papel crucial durante vários processos fisiológicos e patológicos, como veremos a seguir.

5. METALLOPEPTIDASES

5.1. Metalopeptidases de Matriz Extracelular (MMPs)

As MMPs são um grupo de hidrolases do tipo endopeptidases, classificadas em quatro subgrupos principais, de acordo com a estruturas dos seus domínios (NAGASE E WOESSNER, 1999; BODE et al., 1999) (Fluxograma 2).



Fluxograma 2: Classificação das metaloendopeptidases. Extraído de: Barret E Woessner eds. Handbook of Proteolytic Enzymes. Academic Press, 1998

Estas endopeptidases dependem da ligação de um metal, geralmente o zinco, em seu sítio ativo para serem cataliticamente ativas. A família das MMPs é caracterizada pela presença de domínios protéicos conservados: um **pró-domínio** um **domínio ativo (domínio de ligação com o íon zinco)** (NAGASE E WOESSNER, 1999). O domínio de ligação com o íon zinco contém a sequência altamente conservada HEXGHXXGXXH, na qual três histidinas são responsáveis para a coordenação do íon catalítico zinco. Juntamente com o domínio ativo, elas contituem o sítio ativo, do qual a estrutura tridimensional é altamente semelhante nos diferentes tipos de MMPs (MORGUNOVA et al., 1999). As MMPs participam

de vários processos fisiológicos como o remodelamento tecidual, o envelhecimento protéico, a angiogênese e a fertilização (DeCLERCK, 2000).

Em mamíferos, o nível constitutivo de expressão de genes para MMPs é baixo, e uma superexpressão de MMPs pode desencadear diversos estados patológicos, tais como Mal de Alzheimer, Artrite, Aterosclerose, Câncer (CURRAN E MURRAY, 2000). A modulação da expressão das MMPs é realizada através da inibição da transcrição gênica, produção de inibidores específicos de MMPs (TIMPs) e da expressão de MMPs na forma de zimogênio (LAFLEUR et al., 2001).

A Gelatinase B (MMP-9) é um exemplo de MMP típica, importante para a migração de diferentes tipos celulares, incluindo as células tumorais, devido à sua habilidade de degradar membranas basais e componentes da MEC, tais como colágeno, elastina e agrecana (PRUIJT et al., 1999) permitindo com isso, o extravasamento das células. Ela também desempenha papel crucial na formação de novos vasos, processo essencial para o desenvolvimento e manutenção dos tumores (BERGERS et al., 2000). Células de carcinoma utilizam as MMPs para digerir a membrana basal, invadir tecidos vizinhos e metastatizar diferentes órgãos (CHANG E WERB, 2001). A produção de MMPs através do estroma (fibroblasto, células endoteliais e inflamatórias) é regulada pelas célula tumorais através da expressão de citocinas e indutores de MMPs. Um outro exemplo é o do TGF- β (Fator de Crescimento Transformante do tipo β), importante para sinalizar e modular o equilíbrio entre a formação/reabsorção de osso fisiológica, e YU E STAMENKOVIC, 2001 mostraram que, in vitro, as MMP-9 e MMP-2 podem clivar

proteoliticamente o TGF- β e com isso ativá-lo (este possivelmente é um dos mecanismos de ativação do TGF- β).

Durante a ocorrência de patologias vasculares, o balanço entre as proteases e seus inibidores é temporariamente destruído através da indução da expressão gênica de MMPs em células vasculares ou pela secreção de enzimas pelas células inflamatórias (JACOB, 2003). Se este desbalanço perdurar por um longo período de tempo, pode ocorrer a estenose ou a dilatação dos vasos, causando doenças como a aterosclerose e o aneurisma (JACOB, 2003).

5.2 – Metalopeptidases e desintegrinas de Mamíferos (ADAMs)

As ADAMs são proteínas transmembranas cuja estrutura é formada por domínios: um pró-domínio, um domínio metalopeptidase, um domínio desintegrina-símile, um domínio rico em cisteína, um domínio contendo um motivo Fator de Crescimento-símile, uma região transmembrana e cauda citoplasmática (WOLFSBERG et al., 1995). Esta organização em domínio sugere que as ADAMs possam desempenhar importantes funções fisiológicas em vários processos, incluindo proteólise, interações célula-célula e célula-MEC e sinalização celular (BLACK E WHITE, 1998). As primeiras ADAMs estavam relacionadas com os processos reprodutivos como a espermatogênese e a fusão óvulo-espermatozóide (WOLFSBERG E WHITE, 1996; MYLES E PRIMAKOFF, 1997; CHO *et al.*, 1998). Há uma grande homologia entre o domínio desintegrina destas moléculas e o das

metalopeptidases de venenos de serpentes (SVMPs), mas nas ADAMs a sequência adesiva presente neste domínio , com exceção da ADAM 15, não é o tripeptídeo RGD como acontece com as SVMPs (ETO et al., 2000). Mais de 30 ADAMs foram identificadas até o momento, mas menos de um terço destas foi caracterizado (HORIUCHI et al., 2003). As ADAMs podem ser encontradas na forma solúvel ou associadas com a MEC ou ainda na superfície de membranas celulares (STREULI, 1999). Algumas ADAMs-T (ADAM com repetições do tipo-1 da trombospondina) podem clivar componentes da MEC (KUNO et al., 1999). A ADAMT-4 é a principal agreganase envolvida na degradação de cartilagem na doença artrítica, mas também pode ser encontrada nos pulmões, cérebro e coração, sugerindo que esta ADAMT possa desempenhar também papel fisiológico (TORTORELLA et al., 1999).

Estudos acerca dos mecanismos que envolvem o desenvolvimento de tumores indicam que as MMPs e as ADAMs são proteínas-chave para a disseminação tumoral, onde as MMPs induzem o crescimento ou a sobrevivência de tumores, a invasão, a angiogênese e as metástases, enquanto que as ADAMs estão relacionadas com a sinalização intracelular e adesão celular (STERNLICHT E WERB, 2001). Estudos mostram que as ADAMs comportam-se como moléculas de adesão celular através da ligação com integrinas e sindecanas (HORIUCHI et al., 2003). As ADAMs, ao se ligarem às integrinas, deslocariam estas do seu alvo na MEC, liberando então a células do seu substrato. Além disso, a ligação do domínio desintegrina com integrinas das células adjacentes pode direcionar MMPs para o sítio de interação integrina/MEC, resultando na degradação da MEC e

facilitando a migração celular (MARTIN et al., 2002). O domínio rico em cisteína das ADAMs está relacionado com a capacidade de promover a fusão de membranas (WOLFSBERG, 1995). As ADAMs estão envolvidas na fertilização (ADAMs 1, 2 e 3) (CHEN E SAMPSON., 1999), fusão de músculos (meltrin- α , ADAM 12)(GILPIN et al., 1998), liberação do Fator de Necrose Tumoral na membrana plasmática (ADAM 17) (WERB E YAN, 1998) e progressão de tumores de origem neural (neuroblastomas – ADAM 23) (SANTIAGO et al., 2000).

5.3. MMPs, ADAMs e fatores de crescimento

Para que ocorra o crescimento tumoral é necessário que haja autonomia da massa tumoral quanto à sua capacidade de migrar, proliferar e de obter nutrientes através da formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) originados à partir de vasos pré –existentes (neoangiogênese). Para que um tumor se desenvolva, é necessário que ele seja capaz de induzir a liberação de fatores estimuladores de crescimento pelas células vizinhas e por ele mesmo. As ADAMs e as MMPs participam da proteólise da superfície celular, levando à liberação de fatores de crescimento ou formas precursoras destes (DARREN E COURTNEIDGE, 2003).

Os fatores de crescimento são componentes críticos para a manutenção da viabilidade celular e das estruturas adjacentes, por também regularem a proliferação, a migração e diferenciação celulares e também a apoptose.

As interações controladas pelos fatores de crescimento são altamente complexas, dependentes do meio extracelular, dos efeitos de outros fatores de crescimento e mecanismos regulatórios que afetam as células. O desbalanço destes fatores pode levar o organismo a várias desordens (KLESKLER E SHEARDOWN, 2004)

Entre os fatores de crescimento conhecidos, será dada uma maior ênfase ao VEGF (Fator de Crescimento de Endotélio de Vaso), já que o objeto de estudo desta tese foi exatamente uma proteína tipo-desintegrina, que possui atividade modulatória sobre este fator de crescimento.

6. ANGIOGÊNESE

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos, importante tanto em condições normais, quanto em condições patológicas. A angiogênese ocorre naturalmente no organismo durante o desenvolvimento embrionário e em resposta a cicatrização de ferimentos para a restauração do fluxo sangüíneo nos tecidos lesados. Em fêmeas, a angiogênese ocorre também durante o ciclo reprodutivo mensal (para a reconstrução da camada uterina interna e maturação do óvulo durante a ovulação) e durante a gravidez (para a formação da placenta, a circulação entre a mãe e feto) (Tonini *et al.*, 2003). O controle da angiogênese se dá através da regulação entre fatores pró e anti-angiogênicos no organismo.

Quando os fatores pró-angiogênicos são produzidos em concentrações maiores que os fatores anti-angiogênicos, dá-se a formação de novos vasos

(angiogênese). Em condições normais, o organismo é capaz de manter o equilíbrio entre os moduladores angiogênicos. Nas situações onde o organismo perde a capacidade de modular a angiogênese, surgem as patologias relacionadas a essa perda (Tonini *et al.*, 2003).

A angiogênese excessiva ocorre em doenças como câncer (tumores sólidos ou hematológicos), doenças cardiovasculares (aterosclerose), degeneração muscular relacionada à idade, cegueira ocasionada pelo diabetes (retinopatia diabética), inflamações crônicas (artrite reumatóide, doença de Crohn), psoríase (lesões caracterizadas pelo aumento do calibre do comprimento de vasos presentes na derme), endometriose e adiposidades (HANAHAN E FOLKMAN, 1996). Nessas patologias, os novos vasos sangüíneos nutrem os tecidos doentes e, no caso do câncer, permitem às células tumorais atingirem a circulação sanguínea normal e alcançar outros órgãos, processo denominado metástase.

Por outro lado, patologias como a dificuldade na cicatrização de tecidos isquêmicos e falência cardíaca são decorrentes da angiogênese insuficiente (CARMELIET *et al.*, 1999; FERRARA E ALITALO, 1999) (a angiogênese insuficiente ocorre quando os tecidos não são capazes de produzir quantidades adequadas de fatores pró-angiogênicos).

Durante a angiogênese, o crescimento das células endoteliais, migração e a formação de tubos são regulados por fatores pró e anti-angiogênicos, proteases que degradam a MEC e interações entre as células e a MEC (SCOTTILE, 2003). A angiogênese é dirigida por numerosos mediadores produzidos por diversos tipos celulares sob uma variedade grande de condições. Estes mediadores podem ser

fatores de crescimento solúveis, ligados à MEC ou à membrana celular ou componentes da própria MEC.

A remodelagem vascular envolve tanto o crescimento quanto a regressão dos vasos sanguíneos, eventos fisiológicos importantes principalmente na infância, durante o crescimento de tecidos e órgãos dos diferentes sistemas orgânicos. A remodelagem, porém, está presente também no adulto, como no crescimento dos cabelos, no reparo de tecidos lesionados e no ciclo reprodutivo feminino (vascularização dos ovários, vias genitais, glândulas mamárias e na organização da placenta).

Um dos fatores de crescimento mais bem estudados e um dos mais potentes fatores pró-angiogênicos é o VEGF, descoberto por Dorak e colegas em meados dos anos 80 (SENGER et al., 1983).

A família VEGF inclui o VEGF-A, -B, -C, -D, -E e o fator de crescimento placentário. Através de “splicing alternativo” podem ser encontradas as seguintes isoformas do VEGF: com 121, 145, 148, 162, 165, 165b, 183, 189 e 206 aminoácidos, sendo as isoformas mais comumente encontradas aquelas contendo 121 e 165 aminoácidos (MATSUMOTO et al., 2001; CROSS et al., 2003; EUBANK et al., 2003), todas diferindo entre si quanto à habilidade de se ligar ao sulfato de heparana e à MEC.

Os receptores de VEGF são expressos em células endoteliais de adultos e na maioria das células durante a embriogênese. Em adultos, o VEGFR-1 é expresso em monócitos, em células mesangiais renais, células musculares lisas e células endoteliais, enquanto que o VEGFR-2 é expresso em células do ducto

pancreático, células progenitoras da retina e células hematopoiéticas (MATSUMOTO et al, 2001).

Os VEGFR não agem sozinhos, mas sim contam com proteínas acessórias e co-receptores para regular a sinalização. Estas proteínas acessórias incluem as caderinas, integrinas, neuropilinas, heparina e proteoglicanas de sulfato de heparana (MATSUMOTO et al., 2001).

O VEGF é o principal fator de crescimento relacionado com a angiogênese, dada à sua habilidade de induzir vasodilatação via produção de NO endotelial, o que aumenta a permeabilidade das célula endoteliais (ZICHE et al., 1997). Além deste efeito vasodilatador, o VEGF pode induzir a expressão de proteases e receptores importantes na invasão celular e no remodelamento, prevenindo com isso a apoptose (GRIFFIOEN E MOLEMA, 2003). Com relação à angiogênese anormal, o VEGF-A é a isoforma mais relacionada com os efeitos patológicos sobre as células endoteliais e o VEGFR-2 é o seu principal mediador (CROSS, 2003).

6.1. Sinalização mediada pelo VEGF e outros fatores de crescimento

A ligação com o VEGF/EGF induz a dimerização do receptor e a autofosforilação nos resíduos de tirosina. Estas fosfotirosinas funcionam como sítios de ancoragem para moléculas sinalizadoras como o complexo Grb2-SOS, o qual ativa a proteína-G Ras através da estimulação da troca da Guanosina Difosfato pela Guanosina Trifosfato. Esta troca faz com que haja uma mudança

conformacional na Ras fazendo com que ela se ligue à Raf-1, recrutando-a do citosol para a membrana celular, onde a Raf-1 é ativada. A ativação da Raf-1 é um processo que envolve várias etapas de defosforilação de sítios inibitórios pela fosfatase 2A (PP2A), bem como a fosforilação de sítios ativadores pela PAK (quinase ativada-p21), família Src e outras quinases. A Raf-1 ativada fosforila e ativa a MEK (MAPK/ERK quinase), a qual fosforila e ativa a quinase regulada por sinal extracelular ERK (CROSS et al., 2003).

A cascata de quinases é estruturada pela KSR (quinase supressora de Ras). A ERK ativada tem vários substratos no citosol (proteínas do citoesqueleto, fosfolipase A2, receptores de tirosinas quinases, receptores de estrógenos, SOS, proteínas transdutoras e ativadas de transcrição (STATs) e outras. A ERK também pode entrar no núcleo para controlar a expressão gênica através da fosforilação dos fatores de transcrição como a ELK-1 e outras proteínas da família Ets (CROSS, 2003), sendo esta a via utilizada pelo VEGF para a indução do crescimento de células endoteliais na angiogênese (CROSS et al., 2003) (Figura 6).

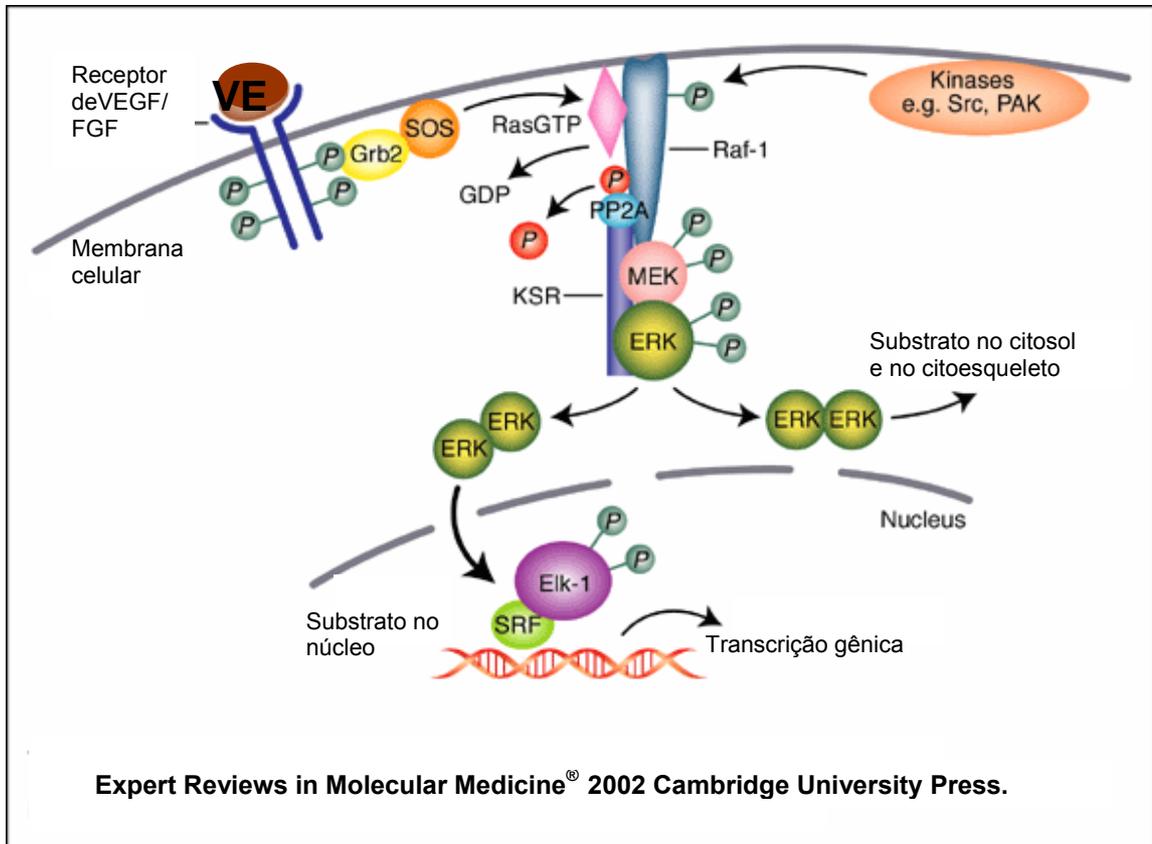


Figura 6: Via de sinalização Ras-Raf-MEK-ERK.

Fonte: <http://ww.-ermm.cbcu.com.oc.uk/02004404h.htm> Acesso em: 17/10/2004

6.1.2. FGF (Fator de Crescimento de Fibroblastos)

Os membros da família FGF também são potentes indutores de angiogênese. As respostas celulares mediadas pelos FGFs incluem migração celular, proliferação e diferenciação (KANDA et al., 1997). A família FGF é formada por 9 peptídeos estruturalmente relacionados, dos quais o FGF-1 (FGF ácido) e o FGF-2 (FGF básico) foram os mais estudados até o momento.

Os efeitos celulares dos FGFs são mediados via ligação específica de alta afinidade com receptores de tirosina quinase (KLEIN et al., 1997). Além destes, existem os receptores de FGF de baixa afinidade que são as proteoglicanas de sulfato de heparana, encontradas tanto na superfície celular como na MEC (KLEIN et al., 1997). A dimerização do receptor pelo FGF é facilitada pela heparina. Isso resulta na ativação da proteína quinase e na autofosforilação do receptor. Esta autofosforilação permite a ligação com proteínas adaptadoras tais como a Grb2, Shc e subseqüentemente ativar a via Ras/Raf-MAPK, que por sua vez induz a proliferação de células endoteliais (KLEIN et al, 1997). A ativação da p42MAPK também está implicada na resposta ao FGF para a motilidade das células endoteliais.

O FGF-1 pode ser endocitado e transportado para o núcleo das células, afetando o ciclo celular na fase tardia G1, promovendo a transição para o estágio S (IMAMURA et al., 1994).

7. METALOPTIDASES DE VENENOS DE SERPENTES (SVMPs).

As SVMPs são sintetizadas na glândula produtora de veneno como proteínas contendo multidomínios, incluindo o domínio pró-enzima e o domínio zinco-protease altamente conservado (HITE *et al.*, 1994; SELISTRE de ARAUJO E OWNBY, 1997).

As metaloproteases de venenos de serpentes (SVMP) digerem componentes da matriz extracelular, tais como colágeno, laminina e fibronectina, provocando hemorragia local e sistêmica nos envenenamentos crotálicos e viperídicos (BARAMOVA *et al.*, 1989), sendo freqüentemente chamadas de hemorraginas. As ADAMs e as SVMPs pertencem à superfamília das zinco-metaloproteases (STOCKER *et al.*, 1995). Uma diferença importante entre estas duas proteínas, é que as SVMPs são proteases ativas, enquanto que cerca de metade das ADAMs têm alterações nas suas sequências relacionadas ao zinco, resultando na perda da atividade proteolítica (BLACK E WHITE, 1998).

Foi sugerido que a região rica em cisteína da ADAM 12 humana mediava a adesão de células tumorais (IBA *et al.*, 1999, ZOLKIEWSKA, 1999). Mais recentemente, foi demonstrado que o domínio rico em cisteína recombinante da Atrolisin-A, uma metalopeptidase obtida do veneno da serpente *Crotalus atrox*, inibe a ligação das células MG-63 ao colágeno (JIA *et al.*, 2000).

As SVMPs são divididas em quatro classes (PI a PIV), de acordo com a massa molecular e a organização dos domínios (BJARNASON E FOX, 1994). A classe PI inclui as SVMPs pequenas, com massa molecular até 24,000 KDa, com pouca ou nenhuma atividade hemorrágica. A classe PII inclui proteínas de médio tamanho e a classe PIII é representada pelas grandes proteínas hemorrágicas com massa molecular ao redor de 55.000 Da, as quais são consideradas as mais potentes toxinas hemorrágicas. Dentro da classe PIV foi descrito somente uma proteína de 95.000 kDa, na qual a atividade hemorrágica é muito baixa (BJARNASON E FOX, 1994). Membros das classes PII possuem, além do

domínio catalítico, um domínio desintegrina, que geralmente é processado liberando as desintegrinas livres. Os membros da classe PIII possuem, além dos domínios catalíticos e desintegrina, um domínio rico em cisteína de função ainda não muito clara, mas que parece funcionar como uma molécula de adesão. Esta diversidade na região C-terminal das SVMPs sugere que estas proteínas possam ser produtos de “splicing” alternativo a partir de precursores comuns, embora ainda não existam evidências experimentais para esta hipótese (Figura 5).

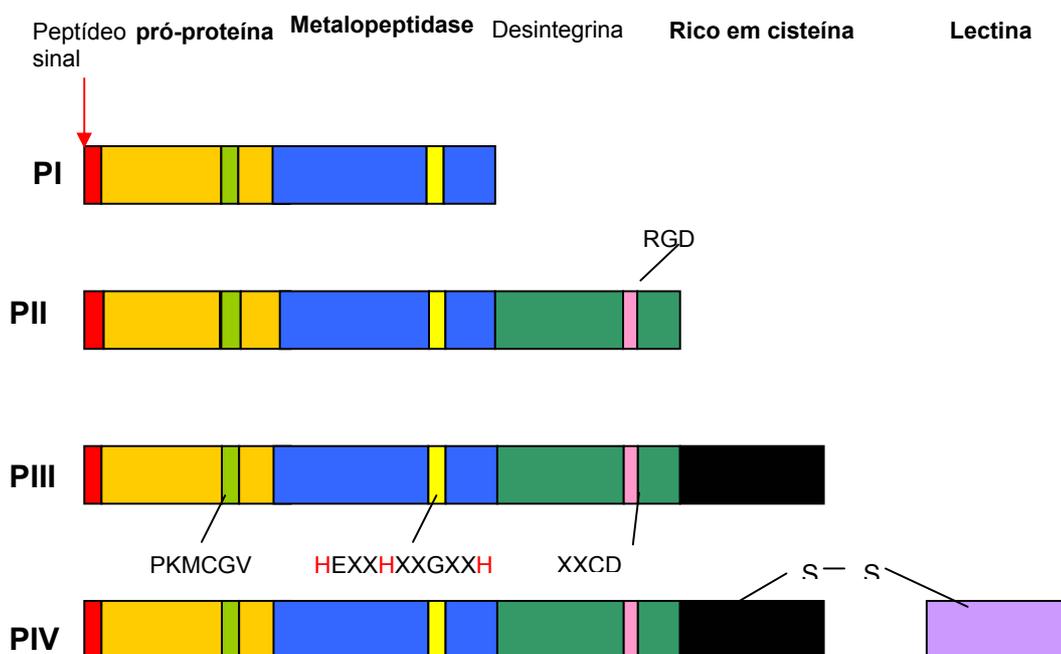


FIGURA 7 – Diagrama esquemático da estrutura das classes de metaloproteases de venenos de serpente. Extraído de: BJARNASON E FOX, 1994.

8. DESINTEGRINAS

O termo desintegrina foi usado pela primeira vez em 1989 para descrever um grupo de moléculas de baixo peso molecular (5-9 kDa), ricos em cisteína, derivados de venenos de serpentes, os quais interagem com receptores da superfície celular (DENNIS et al., 1989; GOULD et al., 1990; NIEWIAROWISK et al., 1994; MAcLANE et al., 1998; HUANG, 1998).

Desintegrinas são potentes inibidores da agregação plaquetária. Algumas desintegrinas possuem a sequência adesiva RGD através da qual se ligam especificamente ao receptor de fibrinogênio, glicoproteína IIb/IIIa de membrana de plaquetas (integrina α_{IIb}/β_3), o que resulta em inibição da agregação plaquetária dependente de fibrinogênio (HUANG E NIEWIAROWSKI, 1994). Diversas desintegrinas foram isoladas e caracterizadas de diferentes venenos de serpentes e sanguessugas, únicas fontes destes potentes inibidores de agregação plaquetária. O domínio desintegrina apresenta uma grande diversidade estrutural e funcional. As desintegrinas derivadas das SVMP da classe PII são normalmente pequenas (5-8 kDa), e geralmente contêm a sequência adesiva RGD (HUANG E NIEWIAROWSKI, 1994). Outras desintegrinas apresentam modificações na região do “loop RGD”, com substituições do resíduo de arginina, resultando em alteração de especificidade. A barbourina é um exemplo de desintegrina não RGD, que possui a sequência Lys-Gly-Asp (KGD) (SCARBOUROUGH *et al.*, 1991). Já o processamento do domínio desintegrina das SVMP da classe PIII gera proteínas maiores (“desintegrina-like”), com massa molecular em torno de 30 kDa, e que não possuem a sequência RGD. A sequência adesiva nestas proteínas parece ser o

tripeptídeo D/ECD (JIA *et al.*, 1997). Estas proteínas possuem ainda uma extensão C-terminal rica em cisteína. O domínio desintegrina derivado das SVMP da classe PIII é potente inibidor da ligação do colágeno a um de seus principais receptores, a integrina $\alpha_2\beta_1$. Devido à homologia das desintegrinas com as ADAMs, os estudos acerca das desintegrinas se intensificaram.

A interação de células normais e malignas com componentes da matriz extracelular, como fibronectina, vitronectina, colágeno tipo IV e laminina, é mediada por integrinas. Receptores de integrinas reconhecem a sequência RGD nos componentes da matriz extracelular. Estudos demonstraram que desintegrinas contendo a sequência RGD são capazes de inibir a adesão de células tumorais à matriz extracelular por competição específica pelos receptores de integrinas (TRIKHA *et al.*, 1994; SHEU *et al.*, 1994; CHIANG *et al.*, 1995). A Triflavina, isolada do veneno de *Trimeresurus flavoviridis*, foi bastante efetiva no tratamento do tromboembolismo pulmonar experimental (SHEU E HUANG, 1994).

As interações entre células neoplásicas e plaquetas contribuem para a disseminação de tumores via circulação sanguínea. A Jarastatina, uma desintegrina RGD isolada do veneno de *Bothrops jararaca* é um potente inibidor de agregação plaquetária, inibindo a migração de neutrófilos in vivo (COELHO *et al.*, 1999). A Salmosina, desintegrina RGD isolada do veneno da serpente coreana *Agkistrodon halys brevicaudus* reduziu significativamente o número de metástases experimentais in vivo, causadas pela linhagem B1610 de melanoma (KANG *et al.*, 2000). Além disso, a Salmosina foi capaz de induzir a levar as células de endotélio

de capilar bovino à desadesão e à apoptose pela ligação direta com a integrina $\alpha_v\beta_3$ (competição com a MEC), (KIWON et al., 2003). A Rhodostomina, uma desintegrina RGD isolada do veneno de *Calloselasma rhodostoma* que se liga à integrina $\alpha_v\beta_3$ em células endoteliais, inibe de maneira dose-dependente respostas angiogênicas induzidas por bFGF, incluindo proliferação, migração, invasão e diferenciação em HUVECs (células endoteliais de veias de cordão umbilical humano) in vitro e in vivo (YEH et al., 2002). A Saxatilina, uma desintegrina também RGD isolada do veneno de *Gloidius saxatilis*, inibe fortemente a agregação plaquetária humana, a proliferação de HUVECs induzida por bFGF e a migração de células de músculo liso induzida pela vitronectina (DOO-SIK et al., 2002).

9. ALTERNAGINA E ALTERNAGINA-C (ALT-C)

A integrina- $\alpha_2\beta_1$ é o principal receptor do colágeno tipo I, o qual possui papel essencial na adesão de células normais e tumorais à matriz extracelular, bem como no desenvolvimento de metástases. Outros estudos demonstram que células do carcinoma ovariano aderem preferencialmente ao colágeno tipo I (FISHMAN et al., 1998). Portanto, desintegrinas que inibem especificamente a ligação do colágeno com a integrina- $\alpha_2\beta_1$, são importantes ferramentas para o estudo deste tipo de câncer metastático e para o desenvolvimento de derivados peptídicos inibidores de células tumorais invasivas (drogas antimetastáticas).

No Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, foram isoladas uma metaloprotease da classe PIII (Alternagina) de 55 kDa e seu domínio processado, ALT-C (30 kDa), do veneno da serpente *Bothrops alternatus*. A Alternagina e ALT-C inibem a adesão mediada pelo colágeno tipo I de células transfectadas K562- $\alpha_2\beta_1$, e a inibição é dose dependente. A IC_{50} é 134 e 100 nM para a Alternagina e ALT-C respectivamente, indicando que o domínio desintegrina é o responsável pela atividade inibitória (SOUZA et al., 2000). A ALT-C tem no domínio desintegrina a sequência adesiva ECD ao invés da sequência RGD.

A ALT-C não se liga às integrinas $\alpha_{11b}\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$ e $\alpha_4\beta_1$, sugerindo especificidade para a integrina- $\alpha_2\beta_1$.

10. OBJETIVOS

Diante da relação encontrada entre alguns componentes de venenos de serpentes (metalopeptidases/desintegrinas) e MMPs/ADAMs existentes em mamíferos e, sendo que estas desempenham papel crucial em importantes processos patológicos tais como angiogênese, câncer, invasão tumoral, desordens circulatórias e outras, este trabalho teve como objetivos:

- Caracterizar os efeitos da ALT-C sobre células tumorais e normais utilizando para tal, ensaios biológicos variados (ensaios de adesão e proliferação celulares);
- Avaliar o potencial anti-metastático da ALT-C in vitro;
- Desenho de peptídeos sintéticos obtidos à partir da seqüência parcial da ALT-C que contenha a seqüência adesiva ECD;
- Ensaios biológicos variados utilizando os peptídeos sintéticos.

11 MATERIAIS E MÉTODOS

11.1 Veneno bruto de *Bothrops alternatus*.

O veneno bruto de *Bothrops alternatus* foi cedido pelo Instituto Butantan de São Paulo, SP.

11.2 Animais utilizados nos experimentos

Foi utilizado coelho albino, macho, pesando aproximadamente 3kg, obtido junto ao Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

11.3 Purificação da ALT-C

A purificação da ALT-C foi realizada conforme metodologia padronizada por SOUZA et al. (2000). Para tal, 50mg de veneno bruto de *Bothrops alternatus* foi solubilizado em 1,0 mL de tampão Tris-HCl (Tris 10mM, NaCl 100mM) pH 8,6, e aplicado em coluna contendo resina de gel filtração Superdex-200 (1.6 cm x 60 cm; matriz com partículas de 13 μ m), Pharmacia, equilibrada com o mesmo tampão. A eluição foi realizada com o tampão acima descrito e o fluxo de 0,5 mL/min. As frações contendo atividade hemorrágica e tamanho esperado (primeiro pico da eluição) foram concentradas em Centricon[®] (Millipore) e submetidas a uma segunda cromatografia na mesma coluna sob as mesmas condições descritas acima.

11.4 Caracterização da ALT-C

Após a segunda cromatografia, as frações referentes ao segundo pico da eluição foram submetidas à análise de massa molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-PAGE (WEBER e OSBORN, 1969; LAEMMLI, 1970), seguida de “western blotting”. Para tal, foi feita a transferência do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose (Imobilon-NC-Millipore) em sistema de transferência MINI-V8/10 (Gibco). A membrana, então, foi incubada com anticorpos primários anti tipo-desintegrina (1:10.000) produzidos em camundongos. Como segundo anticorpo, foi utilizado o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina na diluição recomendada pelo fabricante (Sigma). A ligação dos mesmos às proteínas presentes foi revelada com o substrato BCIP/NBT (Sigma Fast BCIP/NBT Buffered Substrate Tablet - Sigma). As frações cujas bandas no gel de poliacrilamida eram referentes a ALT-C, foram reunidas e concentradas novamente em Centricon[®] até o volume de 1,0 mL.

A proteína assim purificada foi confirmada através da sua capacidade de inibir especificamente a integrina- $\alpha_2\beta_1$, em ensaio de inibição da adesão de células tranfectadas com esta integrina (K562- $\alpha_2\beta_1$) ao colágeno imobilizado (SOUZA et al., 2000).

11.5 Obtenção do Soro Imune Anti-ALT-C em Coelho

11.5.1 Obtenção do soro pré-imune

Antes dos procedimentos necessários para a obtenção do soro imune, foram coletados em bolsa plástica 10mL de sangue do coelho para a obtenção do soro pré-imune. O sangue assim coletado foi colocado no banho a 37°C por 1 hora e 30 minutos até coagular, quando então o soro foi centrifugado em centrífuga refrigerada (Eppendorf) por 10 minutos a 2000g. Após a centrifugação, o soro foi cuidadosamente retirado e transferido para eppendorfs (1,0 mL) e armazenado a -20°C.

11.5.2 Imunização do coelho (obtenção do soro imune)

Foram dissolvidos 100µg de ALT-C em 0,5mL de tampão PBS pH 7,4 e esta solução foi emulsificada com Adjuvante de Freund's Completo em agitador tipo "vortex". Após a agitação, 0,25mL desta emulsão foram injetados I.M. em cada um dos membros posteriores do animal (coelho).

Após seis (06) semanas foi injetada nova dose da emulsão (reforço). Para a obtenção desta segunda dose foi utilizada a ALT-C emulsionada em Adjuvante de Freund's Incompleto.

Após 10 dias, 50mL de sangue foram retirados e tratados de maneira semelhante a descrita acima, e transferido cuidadosamente (para não formar bolhas) para um tubo Falcon.

O soro assim obtido foi testado na presença de anticorpos através de ensaio imunoenzimático (ELISA).

11.5.3 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) (ENGVALL et al., 1971; ENGVALL e PERLMAN, 1971).

Para a realização do ensaio, foi feita a incubação em uma placa de 96 poços de 50ng de ALT-C/ poço/100 μ L de Na₂CO₃ 50mM pH 9.6 durante 24 horas a 4°C. Decorrido o tempo, os poços foram lavados seis (06) vezes com solução de PBS e Tween-20 0,05%, e aos poços foram adicionados 100 μ L da solução de BSA (soroalbumina bovina) 1% em PBS e tween 20 0,05%, para bloqueio dos sítios não ocupados. A placa foi, então, incubada por 2 horas a 37°C. Após a incubação, a placa foi lavada mais duas (02) vezes com a solução de lavagem acima descrita, e, em seguida o soro imune e o soro pré-imune foram adicionados (100 μ L/poço) nos poços em diferentes diluições: 1×10^{-1} a 1×10^{-6} . A placa, então, foi incubada por mais 2 horas a 37°C, quando então os poços foram incubados com o conjugado (1:4000) anti- IgG de coelho marcado com fosfatase alcalina (1 μ L IgG anti-coelho em 5mL de PBS e tween 20 0,05%) por 2 horas a 37°C. Decorrido o tempo, os poços foram lavados por seis (06) vezes com solução de lavagem e, por fim, 100 μ L da solução reveladora (1mL de Alkaline Phosphatase Substrate Kit Diethanolamine Buffer em 5mL água Milli-Q, adicionado de um tablete de p-nitrofenolfosfato). Após o aparecimento da cor amarela nos poços

indicando que houve a clivagem do substrato na amostra, foi feita a interrupção da reação com NaOH 1M e a leitura da placa realizada em leitor de placas MRX Dynex a uma absorvância de 405-420nm.

11.5.4 Purificação Parcial da Fração γ -Globulina do Anti-soro Anti-ALT-C

11.5.4.1 Precipitação da γ -globulina em Solução Saturada de Sulfato de Amônio pH 7,8.

O soro foi mantido sob agitação lenta por 3 horas a 4°C e a adição da solução saturada de sulfato de amônio pH 7,8 foi feita gota a gota. Decorrido o tempo, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 2.000g.

Após a centrifugação o precipitado resultante foi dissolvido em tampão PBS, em volume igual ao volume inicial do soro. Foi feita então nova precipitação e em seguida procedeu-se nova centrifugação em condições já descritas. O precipitado resultante foi então dissolvido em tampão PBS, em metade do volume inicial do soro. A amostra foi dialisada contra tampão PBS para a dessalinização, e não foi necessária a concentração da amostra. Com a amostra já dessalinizada, foi realizada a purificação da fração IgG propriamente dita.

11.5.4.2 Cromatografia de Afinidade em Sepharose Proteína A para Separação de IgG

Após equilibrar a coluna Sepharose Proteína A com tampão PBS pH 7,4, a eluição da amostra (3mL de cada vez) foi feita com o mesmo tampão (fluxo de 0,5mL/min) até a densidade ótica (D.O.) chegar em 280nm. A fração ligada à coluna foi eluída com tampão Glicina 0,1M pH 2,5 e as frações eluídas foram neutralizadas com NaOH 1M. Foi feita a leitura das frações obtidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 280nm. Os picos referentes as frações de interesse foram agrupados e dialisados contra tampão PBS para a dessalinização.

11.6 Ensaios de Adesão

11.6.1 Linhagens Celulares

Para a realização dos ensaios foram utilizadas as seguintes linhagens celulares:

Tabela3 – Linhagens celulares utilizadas nos experimentos

Linhagem Celular	Tecido	Características
NITH3T3	Fibroblasto embrião de camundongo	Aderente; não tumoral
ECV-304	Carcinoma epitelial de bexiga	Aderente, tumoral
HeLa	Carcinoma epitelial cérvix	Aderente, tumoral
K562-$\alpha 2\beta 1$	Eritroleucemia humana transfectada com a integrina $\alpha 2\beta 1$	Não-aderente; tumoral
MDA-MB-231	Carcinoma mamário	Aderente, tumoral, invasiva, migratória.
MCF-7	Carcinoma mamário	Aderente, tumoral, dependente de estrógeno.

Como a ALT-C possui especificidade para a integrina- $\alpha_2\beta_1$, foram realizados ensaios com as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7, onde a linhagem MDA-MB-231 expressa altos níveis da integrina- $\alpha_2\beta_1$, sendo altamente migratória e invasiva. Por sua vez, a linhagem celular MCF-7 é pouco migratória, invasiva e expressa baixos níveis da integrina- $\alpha_2\beta_1$.

Estas duas linhagens são oriundas de metástase pleural decorrente de neoplasia mamária. A Linhagem MCF-7 é uma linhagem dependente de estrógeno enquanto que a Linhagem MDA-MB-231 não possui receptores de estrógeno em sua superfície celular.

11.6.2 Cultivo das Células

As células, com exceção da linhagem MCF-7, foram cultivadas em meio DMEM (Modified Dubelcco's Minimum Medium - CULTILAB), contendo 10% de soro fetal bovino (CULTILAB), 10mM de L-glutamina (SIGMA), 2,5 μ g de anfotericina-B (Gibco) e 10mL da mistura de penicilina-estreptomicina (Gibco) a 37°C, em estufa com 5% de CO₂.

As células MCF-7 foram cultivadas em meio DMEM/F-12, contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), 1% de L-glutamina, 1% da solução de penicilina-estreptomicina, 1% de anfotericina-B (Gibco), 1% da solução de aminoácidos não-essenciais e tampão HEPES solução 1M (concentração final de 2mM), a 37°C, em estufa com 5% de CO₂.

11.6.3 Ensaio de Inibição da Adesão Celular

Para o ensaio de inibição da adesão celular, o colágeno tipo I ($1\mu\text{g}/100\mu\text{L}/\text{poço}$) diluído em ácido acético 0,1% foi imobilizado por 12 horas em placa de 96 poços (Falcon, Pittsburg, PA) a 4°C . Decorrido o tempo da imobilização do Colágeno tipo I, foi feito o bloqueio dos poços com soroalbumina bovina (solução de BSA 1% solubilizada em **tampão de adesão**: HEPES 20mM acrescido de NaCl 150mM, MgCl_2 5mM e MnCl_2 0,25mM pH 7,4 – $200\mu\text{L}/\text{poço}$) por 2 horas. O bloqueio é feito com o intuito de se certificar que a adesão das células seja somente a proteína imobilizada nos poços, já que sobre BSA não ocorre adesão celular. Após o bloqueio, as células (5×10^6 células/ mL) foram marcadas através da incubação destas com $12,5\mu\text{M}$ de diacetato 5-clorometilfluoresceína (CMFDA) em tampão de adesão por 30 minutos a 37°C . Após a lavagem das células com o mesmo tampão de adesão para a retirada do excesso de CMFDA, a ALT-C foi adicionada às células (0; 1,7; 3,4; 5,1; 6,8 e $8,6 \mu\text{M}$) e estas foram transferidas para a placa (1×10^5 células/poço) e incubadas por 30 minutos a 37°C . Após a lavagem dos poços com o tampão de adesão para a retirada das células não aderidas, as células remanescentes foram lisadas com Triton X-100 ($100\mu\text{L}/\text{poço}$) 0,5% por 30 minutos e ao abrigo da luz. Os poços recobertos por colágeno tipo I que só receberam as células sem a ALT-C foram chamados de

controle positivo de adesão, e como controle negativo, os poços que receberam somente BSA 1% e células marcadas.

Paralelamente, uma curva padrão foi preparada na mesma placa usando concentrações conhecidas de células marcadas. A placa foi lida através do fluorímetro SpectraMax Gemini XS (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) com filtros de excitação de 485-nm e emissão de 530-nm. O programa utilizado foi o SOFTmax PRO versão 3.1.2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

11.6.3.1 Determinação da IC₅₀ da ALT-C para as Linhagens Celulares

Para a determinação da IC₅₀, o colágeno tipo I (1µg/100µL/poço) diluído em ácido acético 0,1%, foi imobilizado por 12 horas em placa de 96 poços a 4°C. Após o bloqueio dos poços com BSA 1% em tampão de adesão - 200µL/poço), as células marcadas com CMFDA foram incubadas com diferentes concentrações de ALT-C-C (0; 0,3; 0,86; 1,7; 5,1 e 6,8nM) e adicionadas aos poços (1 x 10⁵ células/ /poço) por 30 minutos a 37°C. Após a lavagem dos poços com o tampão de adesão para remover as células não aderidas, as células remanescentes foram lisadas e a placa foi lida como descrito anteriormente. O controle positivo da adesão foi feito com colágeno tipo I (1µg/100µL/poço) e o controle negativo da adesão foi feito com BSA 1%. O cálculo para se determinar a IC₅₀ a partir da concentração de ALT-C *versus* porcentagem de inibição da adesão celular foi feito

através do programa ORIGIN 6.1 V6.1052 (B232)(ORIGINLab Corporation, Northampton, MA).

11.6.4 Ensaio de Promoção da Adesão Celular

Para o ensaio de promoção da adesão celular, a ALT-C (10µg/100µL/poço) em tampão de adesão, foi imobilizada por 12 horas em placa de 96 poços a 4°C. Após o bloqueio dos poços com BSA 1%, as células marcadas com CMFDA (já descrito) foram adicionadas aos poços (1 x 10⁵ células/ /poço) por 30 minutos a 37°C. Após a lavagem dos poços com o tampão de adesão para remover as células não aderidas, as células remanescentes foram lisadas e a placa foi lida como descrito anteriormente. O controle positivo da adesão foi feito com colágeno tipo I (1µg/100µL/poço) e o controle negativo da adesão foi feito com BSA 1%.

11.6.5 Ensaio de Desadesão Celular

Para o ensaio de desadesão celular, celular, o colágeno tipo I (1µg/100µL/poço) foi imobilizado por 12 horas em placa de 96 poços a 4°C. Após o bloqueio dos poços com BSA 1% (200µL/poço), as células marcadas com CMFDA foram transferidas para a placa (1 x 10⁵ células/poço) e incubadas por 30 minutos a 37°C. Após a lavagem dos poços com o tampão de adesão para a retirada das células não aderidas, foi adicionada a ALT-C (10µg/100µL/poço) por 2

horas a 37°C. Nos controles positivo e negativo foi adicionado somente o tampão de adesão. Após a lavagem dos poços para a retirada das células não aderidas, as células remanescentes foram lisadas com Triton X-100 0,5%. A curva padrão e a leitura da placa foram feitos como descrito anteriormente.

11.6.6 Ensaio de Proliferação Celular

Para o ensaio de proliferação, as células foram adicionadas aos poços (2,5 x 10⁴ células em DMEM com 10% de FBS - 200µL/poço - placa de 96 poços) e incubadas a 37°C por 2 horas em estufa com 5% de CO₂. Decorrido o tempo, foi feita a lavagem dos poços com tampão PBS pH 7.4, e a ALT-C em DMEM acrescido de 10% de FBS foi adicionada aos poços nas concentrações de 1; 2,5; 5; 10; 40 e 100nM por 24, 48 e 72 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após cada tempo, o meio de cultura dos poços foi aspirado e foram adicionados 50µL/poço de solução de MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue – SIGMA) na concentração de 0,5mg/mL e as placas foram novamente incubadas por 4 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. O precipitado formado foi então solubilizado com isopropanol e a leitura da placa foi feita em leitor de placas MRX Dynex a uma absorvância de 595-nm e filtro de 690-nm.

Aqui também foi feita a curva padrão já descrita anteriormente.

11.6.7 Ensaio de Citotoxicidade da ALT-C para a Linhagem Celular NITH3T3-TK

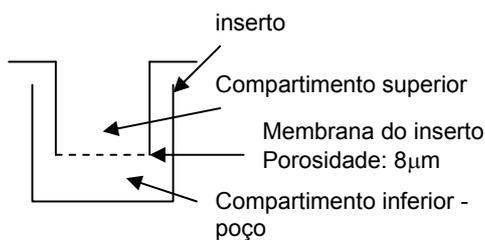
Para o ensaio de citotoxicidade, as células NITH3T3-TK foram adicionadas (1×10^5 células/mL de meio DMEM com 10% de FBS – 200 μ L) aos poços (placas de 96 poços) e incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas. Decorrido o tempo, o meio de cultura foi aspirado e os poços foram lavados com tampão PBS (phosphate-buffered saline) pH 7,4. Em seguida, a ALT-C diluída em meio DMEM sem soro foi adicionada aos poços (200 μ L/poço) nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 μ M e as placas incubadas por 2, 6 e 12 horas a 37°C. Decorrido os tempos, a ALT-C foi retirada e os poços foram lavados com PBS. Foi então adicionado 200 μ L/poço de DMEM sem FBS e as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após as 48 horas, o meio de cultura foi aspirado e foram adicionados 50 μ L da solução de 1mg/mL de MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue – SIGMA) seguida de incubação por 3 horas a 37°C. O precipitado formado foi então solubilizado com DMSO e a leitura das placas foi feita em leitor de placas MRX Dynex a uma absorvância de 595-nm e filtro de 690-nm.

Paralelamente foi feita uma curva de calibração, onde células com concentrações conhecidas foram incubadas com MTT. A relação entre a absorvância e a concentração de células é linear e através da equação da reta

pôde-se determinar a concentração de células em uma amostra desconhecida, partindo-se da absorbância da solução.

11.6.8 Ensaio de Migração Celular mediado pela ALT-C na presença e na ausência de colágeno tipo I (linhagens celulares: MDA-MB-231 e MCF-7).

Representação esquemática do sistema de cultura sobre o inserto:



Para a realização do ensaio de transmigração celular, o colágeno tipo I (0,1mg/mL) diluído em ácido acético 0,1%, foi imobilizado (600µL/compartimento inferior e 100µL /compartimento superior) por 12 horas em placa de 24 poços (Transwell® - COSTAR – diâmetro 6,5mm e 8,0µm de porosidade) a 4°C. Decorrido o tempo, o conteúdo dos compartimentos foi aspirado e os poços e os insertos foram tamponados durante 10 minutos com meio DMEM/F-12 acrescido de BSA 0,2%. O conteúdo dos compartimentos foi novamente aspirado e a ALT-C solubilizada em DMEM/F-12/BSA 0,2% foi adicionada (600µL/poço) no compartimento inferior nas concentrações de 0,1; 10; 100 e 1000nM. Após a adição da ALT-C, os insertos foram colocados dentro dos poços e as células

foram adicionadas aos insertos (4×10^4 células/100 μ L/inserto). A placa foi então incubada a 37°C em estufa de CO₂ por 24 horas.

Decorridas as 24 horas, as células que migraram através da membrana foram coradas e quantificadas. Para tal, a membrana do inserto foi fixada com PAF 4% (paraformaldeído) durante 5 minutos. Após a fixação a membrana foi lavada com tampão PBS e as células que não migraram foram retiradas com o auxílio de cotonete (que ficaram na superfície superior da membrana do inserto) embebido em tampão PBS. Após a limpeza a membrana foi corada com solução de cristal violeta 0,2% (0,2g cristal violeta, 20mL de metanol e 79,80 mL de água) durante 5 minutos e lavada em água corrente. Após a lavagem, a membrana foi recortada e colocada dentro do compartimento inferior do sistema de cultura. Por fim, o corante foi eluído com 100mL da mistura de 50mL de etanol, 2,94g de citrato e 47,06mL de água – pH 4,2. Após a eluição do corante, o conteúdo dos poços foi transferido para uma placa de 96 poços e foi feita a leitura da placa em leitor de ELISA a 540nm.

Paralelamente e sob as mesmas condições, foi realizado o ensaio de migração celular sem o recobrimento dos insertos por Colágeno tipo I. Também foi feita uma curva de calibração para cada linhagem celular utilizada, para a transformação dos valores obtidos da densidade ótica em número de células.

11.6.9 Zimografia para Detecção da Expressão de Metalopeptidases (MMPs)

11.6.9.1 Preparação das Amostras

Células da linhagem de fibroblastos NITH3T3 foram semeadas (4×10^4 céls./mL DMEM acrescido de FBS 10%) em placas de 12 poços, durante 24, 48 e 72 horas a 37°C em estufa com CO₂. Os poços foram assim distribuídos:

Coluna 1: células cultivadas em poços recobertos com colágeno tipo I (1µg/poço);

Coluna 2: células cultivadas em poços recobertos com ALT-C (400nM/poço);

Coluna 3: células cultivadas em poços recobertos com colágeno tipo I e acrescidas de ALT-C em suspensão (400nM/poço);

11.6.9.2 Análise da fração protéica do extrato celular

As células foram lisadas nos poços com 0,2% Triton X-100 em 0,2M de Tris-HCl, centrifugadas por 10 minutos a 1000g. O sobrenadante foi dosado pelo método de Bradford, acrescido de tampão da amostra sem beta-mercaptoetanol com e sem EDTA (concentração final de 15mM), e 15µg foram aplicados no gel.

11.6.9.3 Análise da fração protéica do meio de cultura condicionado

O meio de cultura foi aspirado e centrifugado a 1500g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi dosado pelo método de Bradford, acrescido de tampão da amostra sem beta-mercaptoetanol com e sem EDTA (concentração final de 15mM) e 15µg foram aplicados no gel.

11.6.9.4 Confecção do gel, corrida e visualização das bandas

Para a zimografia foi utilizada a técnica estabelecida por Kapila et al., 1996. Foi feito um gel de poliacrilamida a 12% e gelatina a 5%. A corrida foi feita a 80V a 4°C. Após correr o gel, este foi incubado com tampão de lavagem (Triton X-100 2,5% em água Milli-Q) por 30 minutos a 37°C, sendo que foi feita uma troca de tampão após 15 minutos). Decorrido o tempo, o gel foi incubado por 20 horas em tampão de incubação (Tris 50mM, CaCl₂ 5mM, NaN₃ 0,02%, pH 8) a 37°C. O gel foi então corado com Comassie Blue R-250 0,5% em ácido acético:álcool isopropílico:água (1:3:6). Para a visualização das bandas, o gel foi descorado com solução de ácido acético 10% , metanol 40% e água 50%.

11.6.10 Ensaio de Inibição da Adesão mediado por Peptídeos Sintéticos

Foram realizados ensaios de inibição da adesão celular ao colágeno tipo I imobilizado com peptídeos baseados na estrutura primária da ALT-C: Os peptídeos foram cedidos pela Profa. Dra. Maria Luiza Vilela Oliva, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

a) C-R-A-S-M-S-E-C-D-P-A-E-H-NH₂ PM – 1406,59

b) C-N-E-L-L-E-V-G-E-E-C-D-NH₂ PM – 1385,59



Seqüência Parcial da ALT-C (SOUZA et al., 2000)

IISPPVCGNELLEVGEEDCGTPENCQNXX (PEPT.b)
XDAATCKLKSGSQCGHXDCCEQCKFTKSGT
E CRASMSECDPAEHCTGQSXXXXXDVFHKN (PEPT. a)
GQPCLDNYGYCYNGNCPINYHAQCYALFGA
DVYEAEDSCFKDNQKGNYYGYCRKENXXXX
XXXXXDVKCGRLYCKDNSPKQNNPCKMFYS
NDDEHKGNVLPGTKCEXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Para o ensaio de inibição da adesão celular, o colágeno tipo I (1µg/100µL/poço) diluído em ácido acético 0,1%, foi imobilizado por 12 horas em placa de 96 poços (Falcon, Pittsburg, PA) a 4°C. Após o bloqueio dos poços 1% de BSA solubilizada em tampão de adesão, as células (5 x 10⁶ células/mL) foram marcadas através da incubação destas com 12,5µM de (CMFDA) em tampão de adesão por 30 minutos A 37°C. Após a lavagem das células com o mesmo tampão de adesão, para a retirada do excesso de CMFDA, os peptídeos sintéticos **a** e **b** (5µg/poço) foram adicionados às células e estas foram transferidas para a placa (1 x 10⁵ células/poço) e incubadas por 30 minutos a 37°C. Após a lavagem dos poços com o tampão de adesão para a retirada das células não aderidas, as células remanescentes foram lisadas com Triton X-100 (100µL/poço) 0,5% por 30 minutos e ao abrigo da luz. Os poços recobertos por colágeno tipo I que só receberam as

células sem os peptídeos foram chamados de controle positivo de adesão, e como controle negativo, os poços que receberam somente BSA 1% e células marcadas.

Paralelamente, uma curva padrão foi preparada na mesma placa usando concentrações conhecidas de células marcadas. A placa foi lida através do fluorímetro SpectraMax Gemini XS (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) com filtros de excitação de 485-nm e emissão de 530-nm. O programa utilizado foi o SOFTmax PRO versão 3.1.2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em triplicata. (ensaios independentes). Os dados foram comparados estatisticamente utilizando-se análise de variância ANOVA e o teste de Dunnett. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ foram utilizados como critério de significância.

13 RESULTADOS

13.1 Purificação da ALT-C

O domínio desintegrina (ALT-C) é obtido através do processamento proteolítico da Alternagina, uma proteína contendo os dois domínios: metalopeptidase e desintegrina (MD).

Para a purificação da ALT-C foi utilizada a metodologia proposta por Souza et al., 2000. Após o primeiro fracionamento, as amostras referentes ao primeiro pico da eluição foram coletadas e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. O primeiro pico refere-se às frações contendo os domínios metalopeptidase/ desintegrina (Fig. 8)

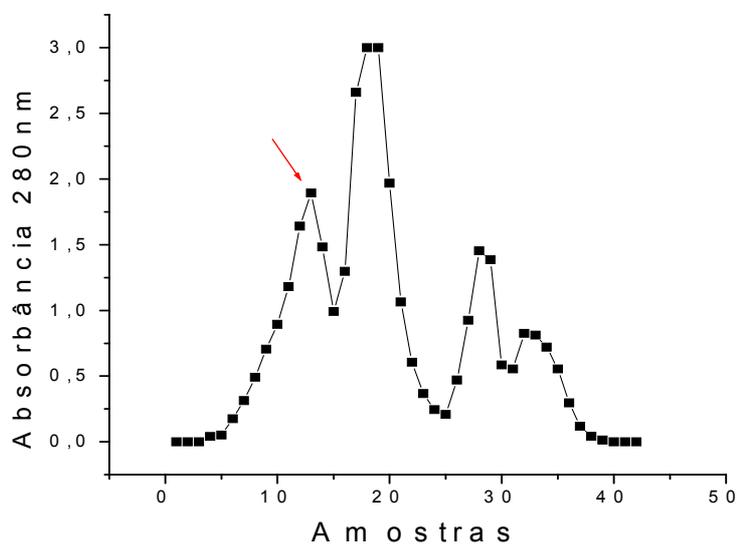


Fig. 8 – Análise do perfil cromatográfico da primeira passagem do veneno bruto de *B. alternatus*. Purificação em coluna de filtração em gel Superdex- 200 (Pharmacia). Amostra eluída com 10 mM Tris-HCl pH 8.6 acrescido de 100 mM de NaCl.

Após a análise das massas moleculares em gel de poliacrilamida-SDS, as frações que continham o domínio metalopeptidase/desintegrina foram reunidas, concentradas e aplicadas novamente na mesma coluna e sob as mesmas condições já descritas.

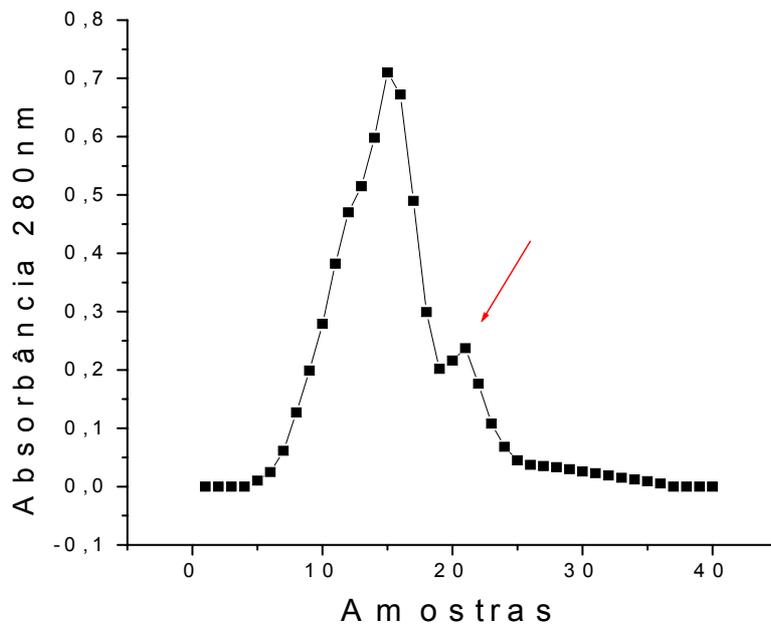


Fig.9 – Análise do perfil cromatográfico da passagem das frações referentes ao primeiro pico de eluição pela coluna de filtração em gel Superdex- 200 (Pharmacia). Amostras eluídas com 10 mM Tris-HCl pH 8.6 acrescido de 100 mM de NaCl.

Após o segundo fracionamento, as frações referentes ao domínio desintegrina (segundo pico de eluição) (Fig.9) foram analisadas por SDS-PAGE (Fig.10), e complementada pela análise em “western blotting” (Fig.11) contra anticorpo específico. O rendimento final para cada 50mg de veneno bruto é de 0,500 mg de ALT-C.

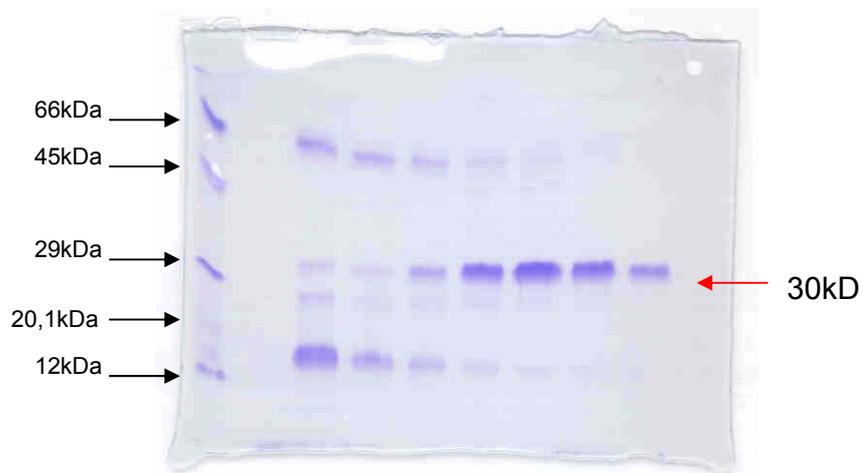


Fig.10 – Análise do perfil eletroforético das frações obtidas na segunda etapa de purificação da ALT-C. SDS-PAGE 15%. 1: Padrão de massa molecular; 6 – 8: frações contendo o domínio desintegrina/Alt-C.

A Fig.11 mostra a imunodeteccção da ALT-C obtida com o anticorpo anti-ALT-C produzido em camundongo (SOUZA et al., 2000).

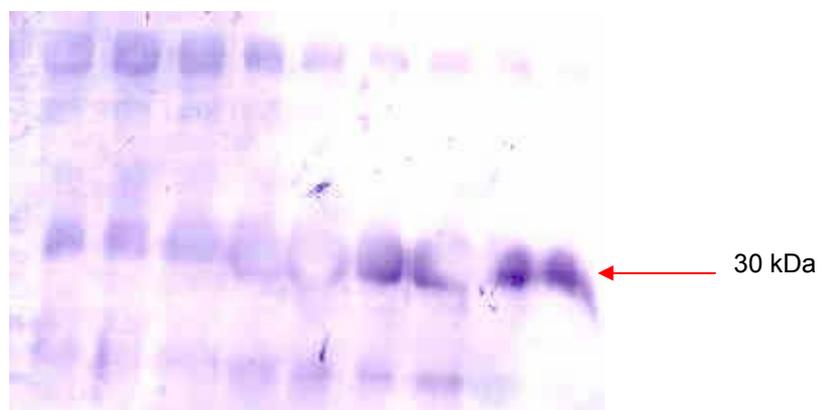


Fig.11 – Análise da imunodeteccção da ALT-C por Western blotting. Frações referentes a ALT-C contra anticorpo anti-ALT-C.

13.2 - Obtenção do Soro Imune Anti-ALT-C em Coelho

Foram realizadas as etapas para a obtenção do soro imune anti-ALT-C em coelho, porque estava previsto o ensaio para avaliar a biodisponibilidade da ALT-C in vivo (concentração plasmática de ALT-C em coelho). Por fim, este experimento acabou não sendo realizado por falta de tempo hábil, mas o anticorpo está disponível para futuros estudos.

A Fig. 12 mostra o perfil cromatográfico da purificação parcial do soro imune anti-ALT-C. O pico evidenciado pela seta indica quais as frações que foram reunidas, dialisadas e aplicadas em coluna de afinidade Sepharose Proteína A, para separação da IgG. Após a passagem da amostra pela coluna de cromatografia, foi realizado mais um ELISA, onde a titulação obtida pelo soro imune foi de 1 : 250.000.

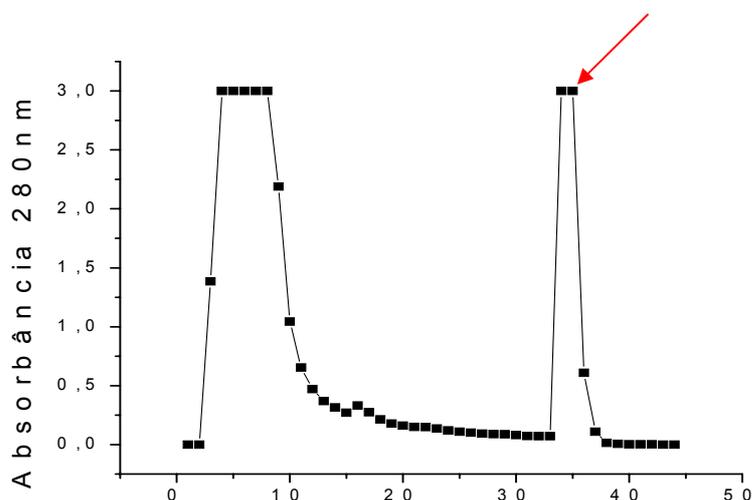


Fig 12: Análise do perfil cromatográfico da eluição do soro imune em coluna de afinidade Sepharose Proteína A. A eluição foi realizada em tampão Glicina 0,1M pH 2,5. As frações eluídas foram neutralizadas com NaOH 1M.

13.3 – Ensaio de Inibição da Adesão Celular mediado pela ALT-C.

Como a ALT-C inibiu a adesão a adesão das células K562- $\alpha_2\beta_1$ ao colágeno tipo I (SOUZA et al., 2000), foram realizados ensaios de inibição da adesão ao colágeno tipo I para outras linhagens celulares, com o intuito avaliar o efeito da ALT-C sobre outras células não transfectadas com a integrina- $\alpha_2\beta_1$.

Como podemos observar nas figuras 13, 14 e 15, a ALT-C inibiu de forma significativa a adesão das linhagens celulares NITH3T3, ECV-304, HeLa e MDA-MB-231 ao colágeno tipo I, com uma IC_{50} de 2,2, 1,66, 1,38 e 0,95 μ M, respectivamente. Com relação à linhagem celular MCF-7, a ALT-C não produziu efeito sobre a inibição da adesão desta linhagem ao colágeno tipo I, talvez devido à baixa expressão da integrina $\alpha_2\beta_1$ por esta linhagem.

Linhagem Celular: NITH3T3.

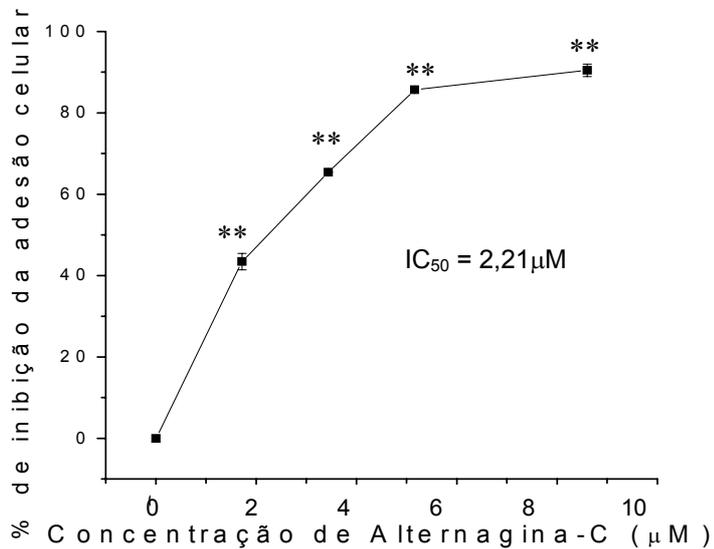


Fig.13 – Efeito da ALT-C sobre a inibição da adesão celular ao colágeno I. Colágeno tipo I (1 µg/poço) foi imobilizado por 12h a 4°C em placa de 96 poços. Após bloqueio com BSA 1%, as células marcadas com CMFDA mais Alt -C (0; 1,7; 3,4; 5,1; 6,8 e 8,6 nM/poço) foram semeadas nos poços. A placa foi incubada a 37°C por 30 min., as células foram lisadas e quantificadas. As barras de erro indicam o S.E. de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

**p < 0,01 foi usado como critério de significância estatística (ANOVA/ DUNNET).

Linhagem Celular: ECV-304.

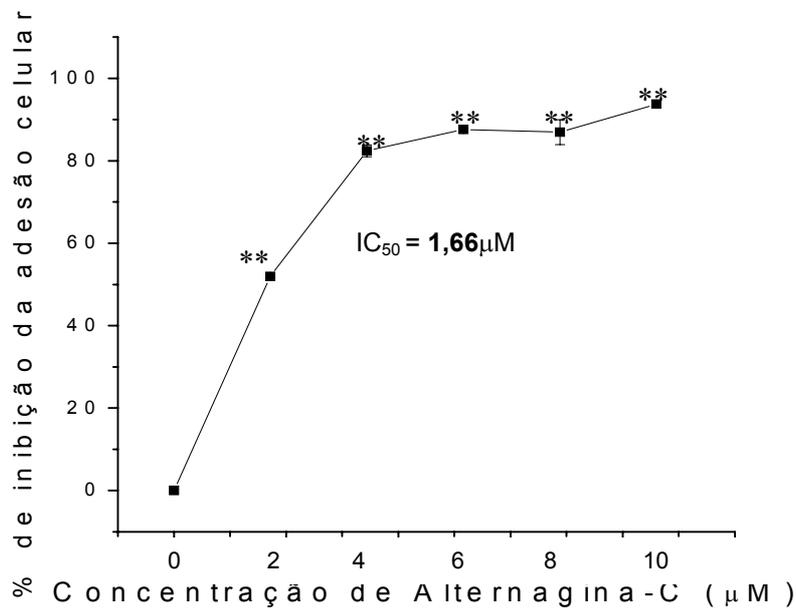


Fig.14 – Efeito da ALT-C sobre a inibição da adesão celular. Colágeno tipo I (1μg/poço) foi imobilizado por 12h a 4°C em placa de 96 poços. Após bloqueio com BSA 1%, as células marcadas com CMFDA mais Alt -C (0; 1,7; 3,4; 5,1; 6,8 e 8,6 μM/poço) foram semeadas nos poços. A placa foi incubada a 37°C por 30 min., as células foram lisadas e quantificadas. As barras de erro indicam o S.E. de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.
 **p < 0,01 foi usado como critério de significância estatística (ANOVA/ DUNNET).

Linhagem Celular: HeLa.

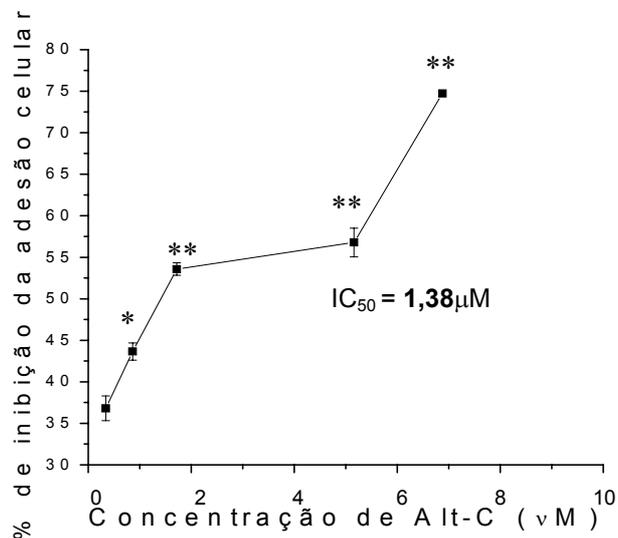


Fig.15 – Efeito da ALT-C sobre a inibição da adesão celular. Colágeno tipo I (1µg/poço) foi imobilizado por 12h a 4°C em placa de 96 poços. Após bloqueio com BSA 1%, as células marcadas com CMFDA mais Alt -C (0; 1,7; 3,4; 5,1; 6,8 e 8,6 µM/poço) foram semeadas nos poços. A placa foi incubada a 37°C por 30 min., as células foram lisadas e quantificadas. As barras de erro indicam o S.E. de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. *p<0,05 e **p< 0,01 foram usados como critério de significância estatística (ANOVA/ DUNNET).

Nas figuras 16 e 17 podemos observar claramente que a ALT-C apresentou efeito inibitório somente na linhagem que expressa altos níveis da integrina- $\alpha_2\beta_1$ em sua superfície (linhagem celular: MBA-MD-231) enquanto que sobre a linhagem MCF-7 que expressa baixos níveis da integrina- $\alpha_2\beta_1$, a ALT-C não exerceu nenhum tipo de efeito. Este resultado vem confirmar a especificidade da ALT-C pela integrina- $\alpha_2\beta_1$.

Linhagem Celular: MDA-MB-231.

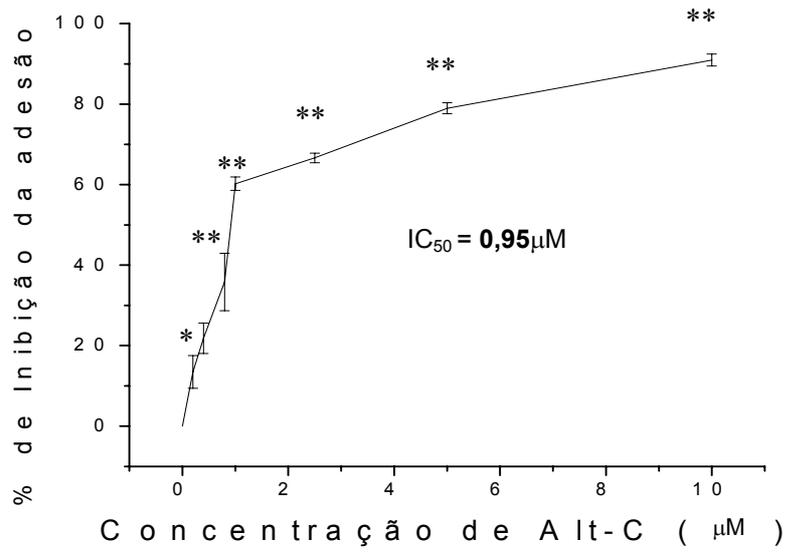


Fig.16 – Efeito da ALT-C sobre a inibição da adesão celular ao colágeno I. Colágeno tipo I (1µg/poço) foi imobilizado por 12h a 4°C em placa de 96 poços. Após bloqueio com BSA 1%, as células marcadas com CMFDA mais Alt -C (0; 1,7; 3,4; 5,1; 6,8 e 8,6 µM/poço) foram semeadas nos poços. A placa foi incubada a 37°C por 30 min., as células foram lisadas e quantificadas. As barras de erro indicam o S.E. de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. *p<0,05 e **p< 0,01 foram usados como critério de significância estatística (ANOVA/ DUNNET).

Linhagem Celular: MCF-7.

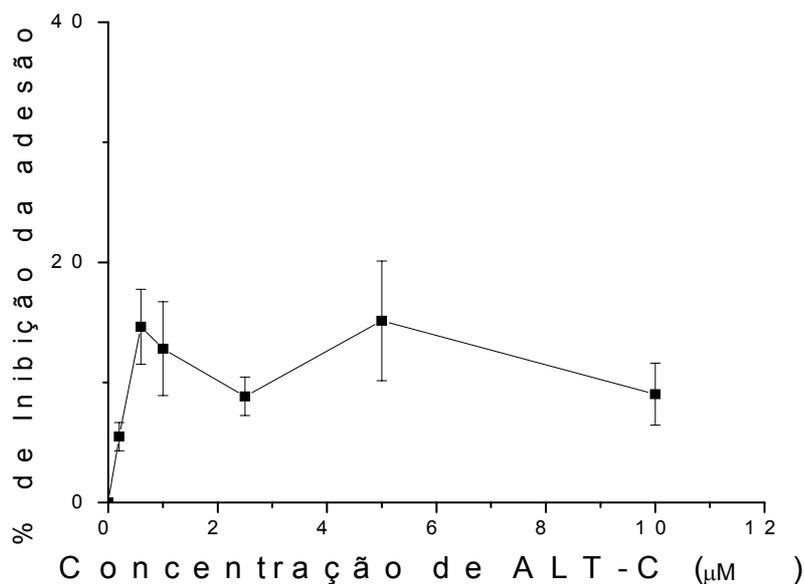


Fig.17 – Efeito da ALT-C sobre a inibição da adesão celular ao colágeno I. Colágeno tipo I (1µg/poço) foi imobilizado por 12h a 4°C em placa de 96 poços. Após bloqueio com BSA 1%, as células marcadas com CMFDA mais Alt -C (0; 1,7; 3,4; 5,1; 6,8 e 8,6 µM/poço) foram semeadas nos poços. A placa foi incubada a 37°C por 30 min., as células foram lisadas e quantificadas. As barras de erro indicam o S.E. de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

13.4 Ensaio de Desadesão Celular mediado pela ALT-C

A desadesão celular normalmente leva à *anoikis* ou seja, uma forma de morte por apoptose que ocorre após a perda da adesão da célula à MEC (EVAN E VOUSDEN, 2000). Sendo assim, este ensaio foi realizado para avaliar se, além de inibir a adesão de algumas linhagens celulares, a ALT-C também poderia levar as células à apoptose, estando estas já aderidas ao seu substrato.

O ensaio foi realizado em dois tempos diferentes (30 minutos e 2 horas), para que houvesse parâmetros de comparação temporal. Primeiramente, foram

realizados ensaios com o tempo de 30 minutos, mas, para todas as linhagens, os resultados foram semelhantes. Surgiu então a dúvida que poderia não haver desadesão por causa do tempo mínimo de exposição das células à ALT-C (30 minutos). Quando os ensaios de desadesão foram novamente realizados, só alterando o tempo de exposição das células à ALT-C, foi observado que a ALT-C realmente não provocou a desadesão celular destas linhagens nas condições testadas. Não houve diferença estatística entre o controle positivo e as células tratadas com a ALT-C.

Os resultados obtidos com o tempo de 30 minutos não foram mostrados por não haver relevância, já que não houve diferenças significativas quando comparados aos resultados obtidos com o tempo de 2 horas.

O ensaio de desadesão das células K562- $\alpha_2\beta_1$ ao colágeno tipo I mediado pela ALT-C foi realizado para verificar se a ALT-C, por interagir especificamente com a integrina $\alpha_2\beta_1$, seria capaz de desaderir esta linhagem celular do seu substrato (Colágeno tipo I). A ALT-C, mesmo utilizadas em concentrações elevadas não foi capaz de desaderir as linhagens celulares NITH3T3, ECV-304 e HeLa (Figs. 18 - 20). Já a figura 21 mostra que em relação ao controle positivo (células crescidas sobre o colágeno) a ALT-C desaderiu apenas com a dose bastante superior (3,5 μ M - cerca de 35 vezes maior do que a IC₅₀, que é de 100nM). A porcentagem de desadesão foi de 11,93%.

Houve uma certa variação da resposta nos ensaios devido às diferenças existentes entre as linhagens celulares estudadas (tempo de

Linhagem Celular: NITH3T3.

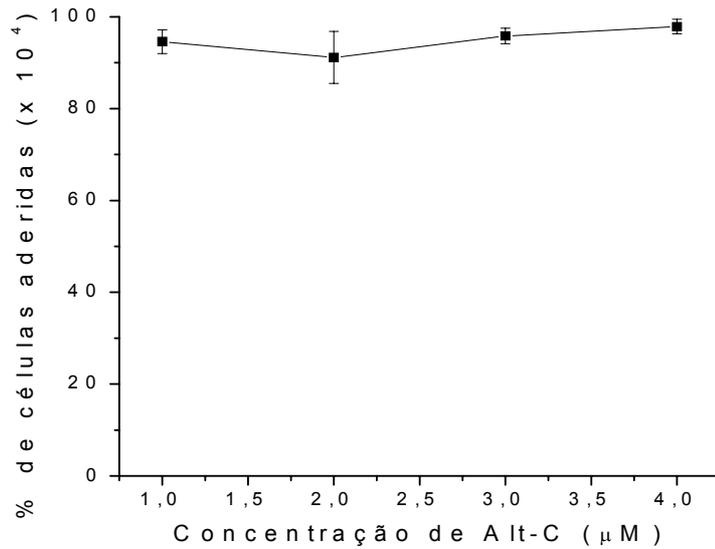


Fig.18 – Efeito da ALT-C sobre a desadesão das células NITH3T3 ao colágeno tipo I. Colágeno tipo I ($1\mu\text{g}/\text{poço}$) em ácido acético 0,1% foi imobilizado “overnight” a 4°C em placa de 96 poços. Após bloqueio com BSA 1%, as células marcadas com CMFDA foram semeadas nos poços. A placa foi incubada a 37°C por 30 min. e então foi adicionada a ALT-C (1; 2; 3 e $4\mu\text{M}/\text{poço}$) e a placa novamente incubada por 30 min. As barras de erro indicam o S.E. de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.
* $p < 0,05$ foi usado como critério de significância estatística (ANOVA/DUNNET). Tempo: 2 horas.

Linhagem Celular: ECV-304.

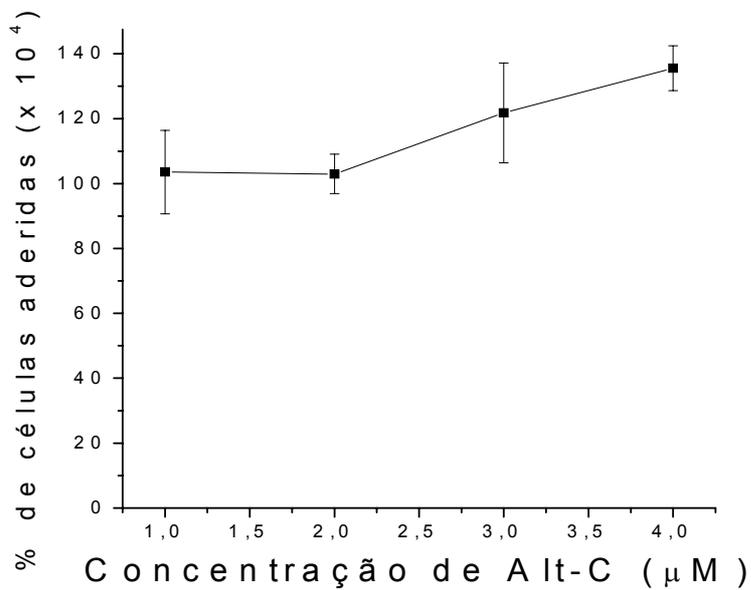


Fig. 19 – Efeito da ALT-C sobre a desadesão das células ECV-304 ao colágeno tipo I. Colágeno tipo I (1μg/poço) em ácido acético 0,1% foi imobilizado “overnight” a 4°C em placa de 96 poços. Após bloqueio com BSA 1%, as células marcadas com CMFDA foram semeadas nos poços. A placa foi incubada a 37°C por 30 min. e então foi adicionada a ALT-C 1; 2; 3 e 4μM/poço) e a placa novamente incubada por 30 min. As barras de erro indicam o S.E. de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. Tempo: 2 horas.

Linhagem Celular: HeLa.

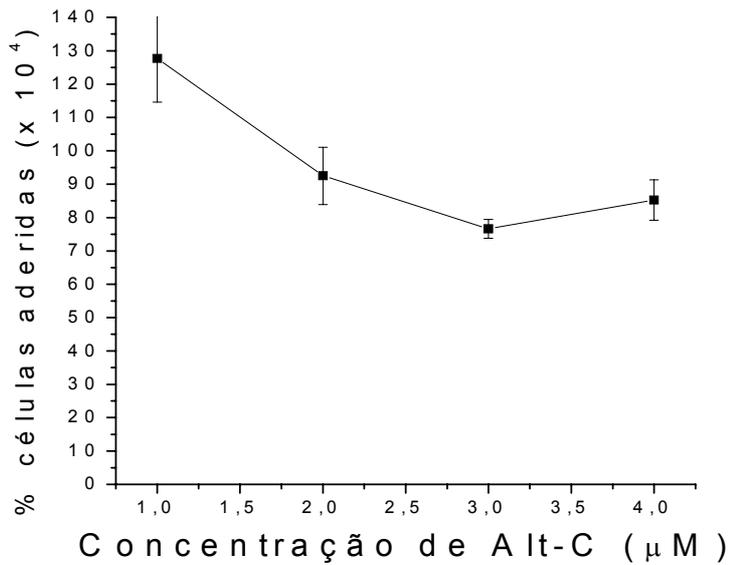


Fig. 20 – Efeito da ALT-C sobre a desadesão das células ECV-304 ao colágeno tipo I. Colágeno tipo I (1μg/poço) em ácido acético 0,1% foi imobilizado “overnight” a 4°C em placa de 96 poços. Após bloqueio com BSA 1%, as células marcadas com CMFDA foram semeadas nos poços. A placa foi incubada a 37°C por 30 min. e então foi adicionada a ALT-C 1; 2; 3 e 4μM/poço) e a placa novamente incubada por 30 min. As barras de erro indicam o S.E. de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. Tempo: 2 horas

LINHAGEM CELULAR: K562- $\alpha_2\beta_1$

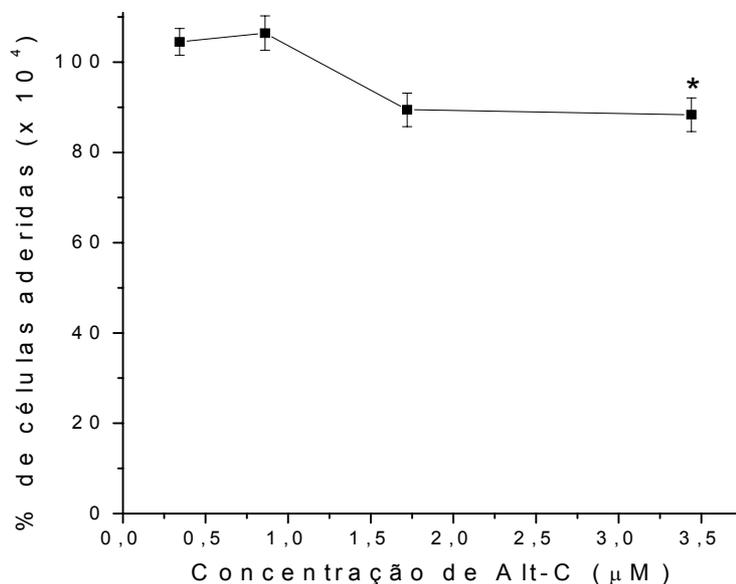


Fig.21 – Efeito da ALT-C sobre a desadesão das células K562- $\alpha_2\beta_1$ ao colágeno tipo I. Colágeno tipo I (1 μ g/poço) em ácido acético 0,1% foi imobilizado “overnight” a 4°C em placa de 96 poços. Após bloqueio com BSA 1%, as células marcadas com CMFDA foram semeadas nos poços. A placa foi incubada a 37°C por 30 min. e então foi adicionada a ALT-C (1; 2; 3 e 4 μ M/poço) e a placa novamente incubada por 30 min. As barras de erro indicam o S.E. de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. *p< 0,05 foi usado como critério de significância estatística (ANOVA/DUNNET). Tempo: 2 horas.

13.5 Ensaio de Promoção da Adesão Celular mediado pela ALT-C.

Como a ALT-C não induziu a desadesão das linhagens celulares estudadas, foram realizados ensaios de promoção da adesão celular, para verificar se a ALT-C imobilizada nos poços poderia agir como uma molécula de adesão, permitindo que as células aderissem à ela.

Através destes ensaios, foi observado que a ALT-C immobilizada nos poços promove a adesão celular de forma semelhante àquela promovida pelo Colágeno tipo I (Figuras. 22 e 23).

Com base nos resultados obtidos, foi utilizada uma concentração menor de ALT-C no ensaio de promoção da adesão com as células HeLa ($1\mu\text{g}/\text{poço}$) que como veremos mais adiante, foi suficiente para promover a adesão celular (Fig.24).

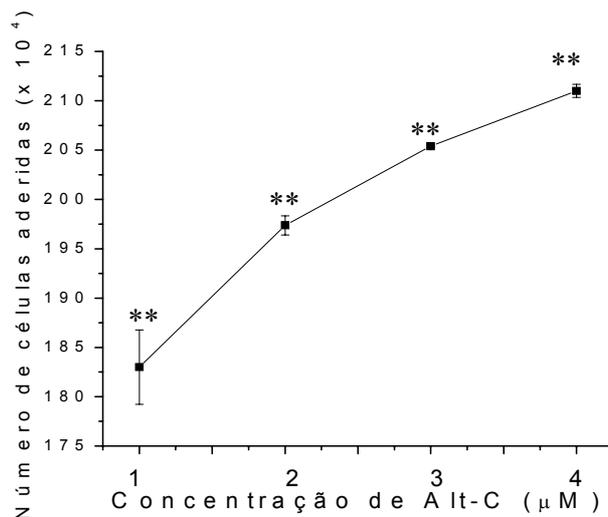


Fig.22 – Curva de promoção da adesão das células NITH3T3-TK ao colágeno tipo I. ALT-C ($10\mu\text{g}/\text{poço}$) em tampão de adesão foi immobilizada “overnight” a 4°C em placa de 96 poços. Após o bloqueio com BSA 1%, as células marcadas com CMFDA foram semeadas nos poços. A placa foi então incubada a 37°C por 30 min. Decorrido o tempo, as células foram lisadas e quantificadas. O experimento foi realizado como descrito no item materiais e métodos. As barras de erro indicam o S.E. de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. $**p < 0,01$ foi usado como critério de significância estatística (ANOVA/ DUNNET).

Linhagem Celular: ECV-304

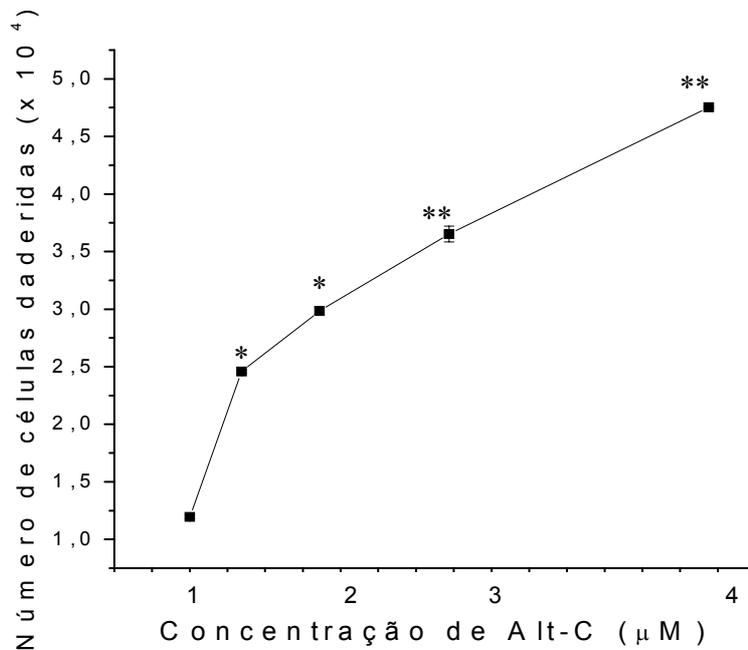


Fig.23 – Efeito da ALT-C sobre a promoção da adesão das células ECV-304 ao colágeno tipo I. ALT-C 1, 2, 3 e 4mM(poço) em tampão de adesão foi imobilizada “overnight” a 4°C em placa de 96 poços. Após o bloqueio com BSA 1%, as células marcadas com CMFDA foram semeadas nos poços. A placa foi então incubada a 37°C por 30 min. Decorrido o tempo, as células foram lisadas e quantificadas. O experimento foi realizado como descrito no item materiais e métodos. As barras de erro indicam o S.E. de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ foram usados como critérios de significância estatística (ANOVA/ DUNNET).

Linhagem Celular: HeLa.

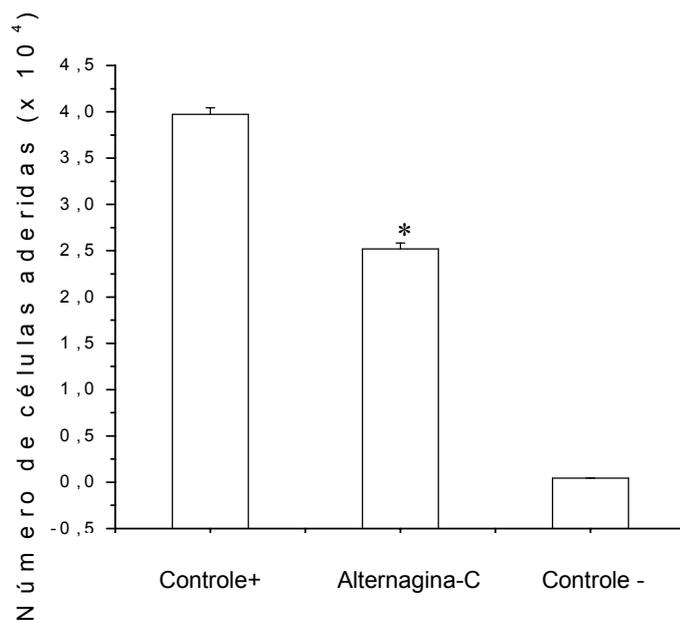


Fig.24 – Efeito da ALT-C sobre a promoção da adesão das células HeLa ao colágeno tipo I.

ALT-C (1µg/poço) em tampão de adesão foi imobilizada “overnight” a 4°C em placa de 96 poços. Após o bloqueio com BSA 1%, as células marcadas com CMFDA foram semeadas nos poços. A placa foi então incubada a 37°C por 30 min. Decorrido o tempo, as células foram lisadas e quantificadas. O experimento foi realizado como descrito no item materiais e métodos. As barras de erro indicam o S.E. de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

*p < 0,05 foi usado como critério de significância estatística (ANOVA/ DUNNET).

13.6 – Ensaio de Citotoxicidade

Como os resultados obtidos nos ensaios de desadesão celular e promoção da adesão celular eram concordantes com uma substância desprovida de efeitos citotóxicos, foi feita a confirmação através da realização do ensaio de citotoxicidade.

O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo método colorimétrico MTT. A técnica original proposta por MOSMANN, 1983, apresenta várias limitações, e algumas modificações foram sugeridas na literatura visando otimizar a sua utilização (Denizot *et al.*, 1986, Carmichael *et al.*, 1987). Dentre elas, podemos citar a omissão do vermelho de fenol no meio de incubação, a fim de evitar qualquer influência de coloração na leitura da absorbância do azul de formazan e a remoção do meio contendo MTT e posterior dissolução do azul de formazan em isopropanol (Richard *et al.*, 1992).

As figuras 25A, 25B e 25C mostram que a ALT-C não teve efeito citotóxico significativo para a linhagem NITH3T3-TK, quando comparado ao controle (células sem tratamento com ALT-C). Como as concentrações utilizadas foram elevadas, este ensaio foi feito somente para a linhagem NITH3T3. A linhagem NITH3T3 não é tumoral, portanto ela foi escolhida para sabermos se a ALT-C teria ou não efeito tóxico sobre as células não tumorais. Este é um resultado importante para saber se futuros experimentos *in vivo* serão viáveis e também para se avaliar a seletividade da substância.

Fig. 25A (2 horas)

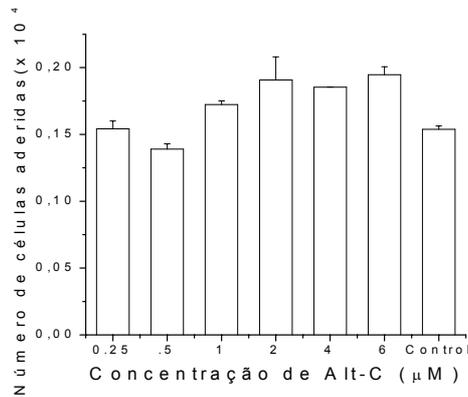


Fig. 25B (6 horas)

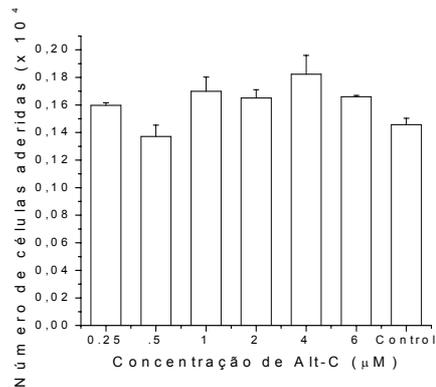


Fig. 25C (12 horas)

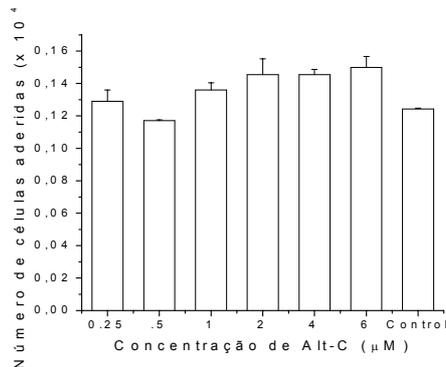


Fig.25A, 25B e 25C – Ensaio de citotoxicidade. As células NITH3T3-TK (1×10^5 células/mL) foram cultivadas em placa de 96 poços por 24h a 37°C . Após a retirada do meio de cultura e lavagem dos poços com PBS, a ALT-C diluída em meio de cultura sem FBS foi adicionada aos poços nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 μM/poço. A placa então foi incubada por 2, 6 e 12h a 37°C. Decorrido os tempos, a ALT-C foi retirada, os poços lavados com PBS, adicionado meio de cultura sem FBS e a placa foi novamente incubada a 37°C por 48h. A quantificação foi realizada com a adição de 50mL da solução de MTT (0,5mg/mL). O experimento foi realizado como descrito no item materiais e métodos. As barras de erro indicam o S.E. de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

13.7 Ensaio de Proliferação Celular mediado pela ALT-C.

Foi dada uma maior ênfase para os ensaios de proliferação celular, devido aos resultados obtidos em colaboração com grupos de pesquisa do Departamento de Biologia Celular e Departamento de Farmacologia da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ). Estes grupos realizaram ensaios para observar o efeito da ALT-C sobre a proliferação de HUVECs (células endoteliais de veia de cordão umbilical humano) e indução de migração de neutrófilos mediada também por esta proteína. Os resultados mostraram claramente que a ALT-C induz significativa proliferação das HUVECs na ausência de VEGF (fator de crescimento de endotélio de vaso) (COMINETTI et al., 2004). A ALT-C também induz eventos de sinalização intracelular mediados por integrina que culminaram com a indução da migração de neutrófilos (MARIANO-OLIVEIRA et al., 2003). Nosso grupo de pesquisa também realizou experimentos semelhantes, tratando fibroblastos humanos com ALT-C. Neste experimento verificou-se que fibroblastos humanos tratados com ALT-C tinham o nível de expressão de VEGF aumentado, resultado este concordante com os demais grupos de pesquisa (COMINETTI et al., 2004).

A partir destes dados foram realizados ensaios de proliferação celular para outras linhagens celulares (NITH3T3, ECV 304 e HeLa), para avaliar se haveria ou não a indução da proliferação destas células pela ALT-C.

Como podemos observar nas figuras 26, 27 e 28, ao contrário do que ocorreu com as HUVECs, a ALT-C não induziu proliferação celular significativa, sugerindo uma especificidade da ALT-C pelas células endoteliais.

Os ensaios tiveram que ser realizados em presença de soro fetal bovino (10%), uma vez que na sua completa ausência houve a desadesão e conseqüente morte celular. Por outro lado, só a presença do soro fetal já é um fator estimulador de proliferação. Desta forma, foi feito o cultivo das células em 2,5, 5 e 10% de soro fetal, com o intuito de diminuir a interferência deste nos experimentos. Somente as células cultivadas com 10% de soro fetal tiveram um desenvolvimento satisfatório, sendo que em doses menores, as células não permaneceram viáveis por mais de 12 horas. Portanto, as células continuaram a ser cultivadas em meio de cultura acrescido de 10% de soro fetal bovino.

Linhagem Celular: NITH3T3

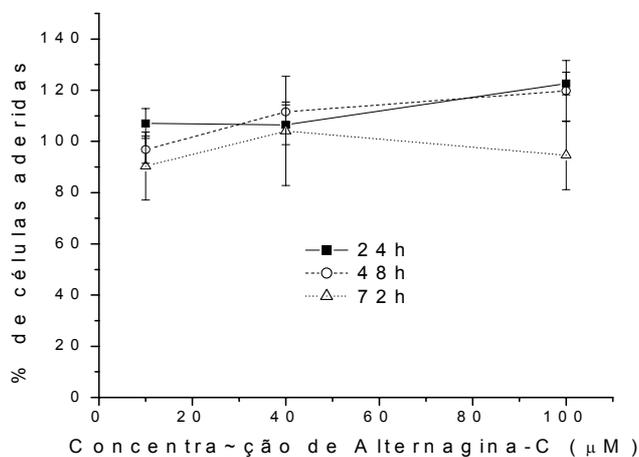


Fig.26 – Efeito da ALT-C sobre a proliferação das células NITH3T3. Células NITH3T3 ($2,5 \times 10^4$ células/poço) foram cultivadas em placa de 96 poços por 2h a 37°C. Após a lavagem, a ALT-C diluída em meio DMEM + FBS 10% foi adicionada aos poços. A placa foi então incubada por 24, 48 e 72h a 37°C. Decorrido o tempo, a ALT-C foi retirada, os poços lavados com PBS, e a placa foi novamente incubada a 37°C por 48h. A quantificação foi realizada com a adição de 50mL da solução de MTT (0,5mg/mL). As barras de erro indicam o S.E. de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

* $p < 0,05$ foi usado como critério de significância estatística (ANOVA/DUNNET).

Linhagem Celular: ECV-304.

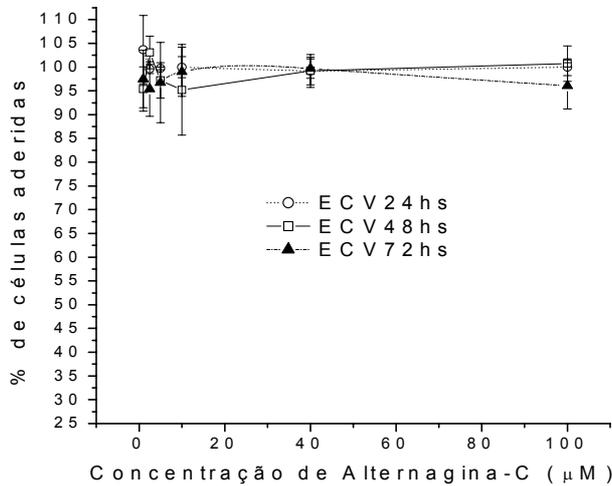


Fig.27 - Efeito da ALT-C sobre a proliferação das células ECV-304. Células ECV 304 ($2,5 \times 10^4$ células/poço) foram cultivadas em placa de 96 poços por 2h a 37°C. Após a lavagem, a ALT-C diluída em meio DMEM + FBS 10% foi adicionada aos poços. A placa foi então incubada por 24, 48 e 72h a 37°C. Decorrido o tempo, a ALT-C foi retirada, os poços lavados com PBS, e a placa foi novamente incubada a 37°C por 48h. A quantificação foi realizada com a adição de 50mL da solução de MTT (0,5mg/mL). As barras de erro indicam o S.E. de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

Linhagem Celular: HeLa.

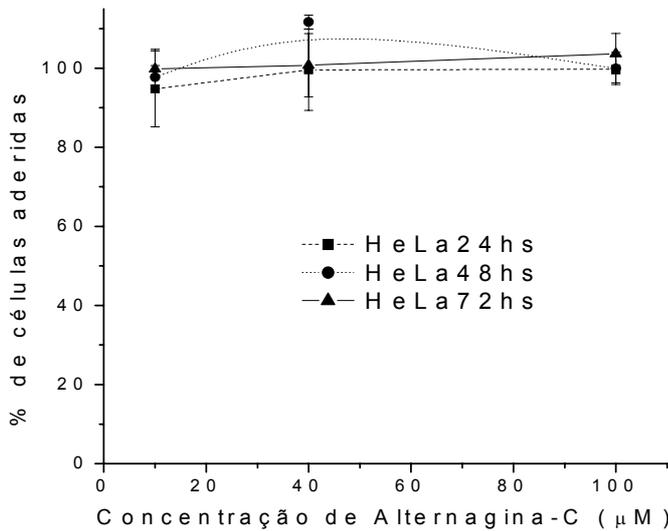


Fig.28 - Efeito da ALT-C sobre a proliferação das células HeLa. Células HeLa ($2,5 \times 10^4$ células/poço) foram cultivadas em placa de 96 poços por 2h a 37°C. Após a lavagem, a ALT-C diluída em meio DMEM + FBS 10% foi adicionada aos poços. A placa foi então incubada por 24, 48 e 72h a 37°C. Decorrido o tempo, a ALT-C foi retirada, os poços lavados com PBS, e a placa foi novamente incubada a 37°C por 48h. A quantificação foi realizada com a adição de 50mL da solução de MTT (0,5mg/mL). As barras de erro indicam o S.E. de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

*p < 0,05 foi usado como critério de significância estatística (ANOVA/DUNNET).

13.8 Ensaio de Migração mediado pela ALT-C na presença e na ausência de colágeno tipo I.

Como podemos observar na fig.29, a ALT-C induziu a migração da linhagem celular MDA-MB-231 na presença de colágeno tipo I. O efeito mais significativo ocorreu quando a concentração de ALT-C utilizada foi de 10nM. Na ausência do colágeno tipo I, não houve diferença entre a migração celular nos poços controle (célula) e nos poços com tratamento (célula + ALT-C). Um dado interessante é que em concentrações acima de 100nM começa a haver uma inibição da migração celular.

Linhagem celular: MBA-MD-231.

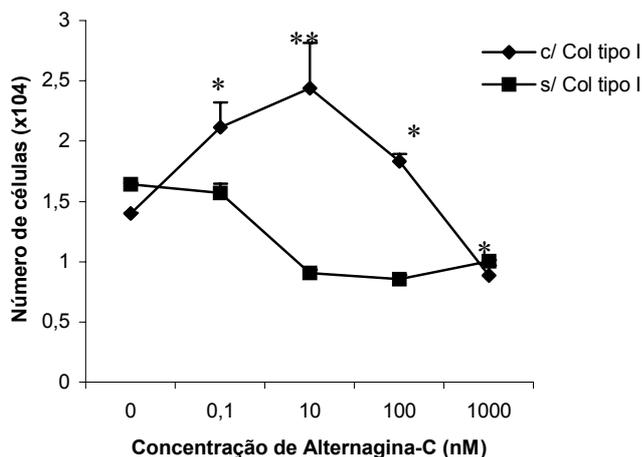


Fig.29 - Efeito da ALT-C na migração das células MDA-MB-231. Colágeno tipo I (0,1mg/mL) em ácido acético 0,1% foi imobilizado "overnight" a 4°C em placa de 24 poços. Após bloqueio com BSA 1%, as células mais a ALT-C (0,1; 10; 100 e 1000nM/poço) foram semeadas nos poços. A placa foi então incubada a 37°C por 24h. As células foram coradas, o corante eluído e a leitura da D.O. foi feita a 540nm. Os valores são em relação ao controle, onde não há a presença da ALT-C. As barras de erro indicam o S.E. de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

*p < 0,05 e **p < 0,01 foram usados como critérios de significância estatística (ANOVA/DUNNET).

Linhagem celular: MCF-7.

Na figura 30 podemos observar que a ALT-C não induziu a migração da linhagem celular MCF-7 na presença ou ausência do Colágeno tipo I. Este resultado já era esperado, pois a ALT-C tem especificidade pela integrina $\alpha 2 \beta 1$, não exercendo portanto nenhum efeito em linhagens celulares que não expressem esta integrina.

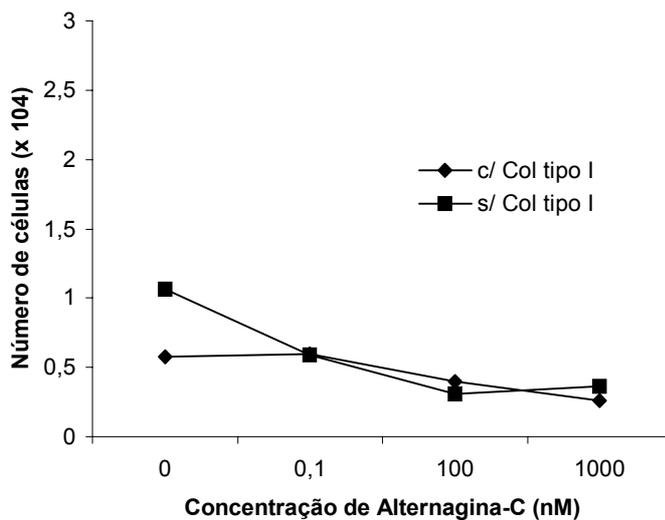


Fig.30 - Efeito da ALT-C na migração das células MCF-7. Colágeno tipo I (0,1mg/mL) em ácido acético 0,1% foi imobilizado “overnight” a 4°C em placa de 24 poços. Após bloqueio com BSA 1%, as células mais a ALT-C (0,1; 100 e 1000nM/poço) foram semeadas nos poços. A placa foi então incubada a 37°C por 24h. As células foram coradas, o corante eluído e a leitura da D.O. foi feita a 540nm.

Os valores são em relação ao controle, onde não há a presença da ALT-C.

As barras de erro indicam o S.E. de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

13.9 Zimografia para detecção da expressão de metalopeptidases (MMPs) em células NITH3T3 tratadas com ALT-C.

Foi utilizada a técnica de zimografia com o intuito de se observar a expressão de metalopeptidases nas células quando estas eram submetidas ao tratamento com ALT-C. A expressão de metalopeptidases pelas células é um dado importante, já que esta expressão está relacionada com a capacidade invasiva da célula. A técnica de zimografia mostrou não haver diferença entre as células tratadas com a ALT-C estando ela em solução ou imobilizada, quando comparada com as células crescidas sobre o colágeno tipo I. As amostras tratadas com EDTA confirmaram a presença de metalopeptidases nas células tratadas ou não com ALT-C. Células cultivadas sobre o colágeno tipo I foram utilizadas como controle. O tempo de tratamento foi de 24, 48 e 72 horas. As Figuras 31A, 31B e 31C mostram que a ALT-C tem efeito semelhante ao do colágeno na expressão de metalopeptidases. Podemos observar também que a expressão de metalopeptidases é mais intensa no meio condicionado, sugerindo que estas proteínas sejam secretadas.

Apesar da zimografia indicar que houve a expressão de metalopeptidases, não foi possível determinar qual ou quais MMPs foram ativadas, dada a falta de padrões necessários para a identificação.

Figura 31A (24 horas)

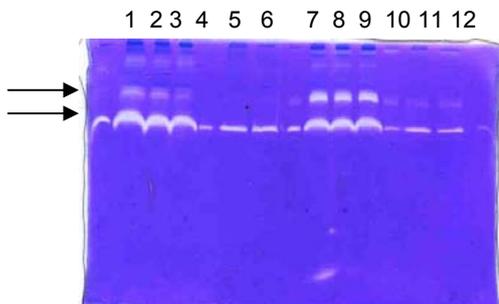
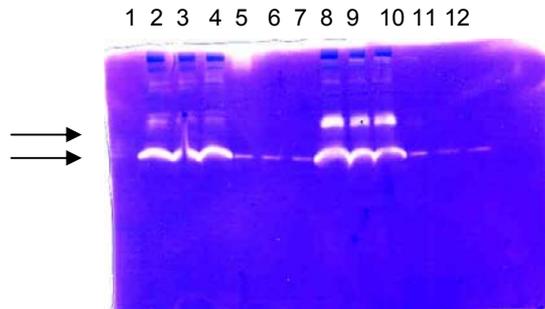


Figura 31B (48 horas)



Figuras 31A e 31B – Análise da expressão de MMPs.

Gel de poliacrilamida a 12% e gelatina a 5%; corrida do gel a 80V e incubação do gel por 20h a 37°C em tampão de incubação. Coloração com Comassie Blue R-250 **0,5% em ácido acético:álcool isopropílico:água (1:3:6)**.

Linhas 1 a 3: Meio de cultura condicionado (MC) sem EDTA.

1 – Células crescidas sobre o colágeno tipo I.

2 – Células crescidas sobre a ALT-C.

3 - Células crescidas sobre o colágeno tipo I e acrescidas de ALT-C em suspensão (400nM).

Linhas 4 a 6: MC + EDTA.

4 – Células crescidas sobre o colágeno tipo I.

5 – Células crescidas sobre a ALT-C.

6 - Células crescidas sobre o colágeno tipo I e acrescidas de ALT-C em suspensão (400nM).

Linhas 7 a 9: Extrato celular (EC) sem EDTA.

7 – Células crescidas sobre o colágeno tipo I.

8 – Células crescidas sobre a ALT-C.

9 - Células crescidas sobre o colágeno tipo I e acrescidas de ALT-C em suspensão (400nM).

Linhas 10 a 12: EC + EDTA.

10 – Células crescidas sobre o colágeno tipo I.

8 – Células crescidas sobre a ALT-C.

12- Células crescidas sobre o colágeno tipo I e acrescidas de ALT-C em suspensão (400nM).

Figura 31C (72 horas)

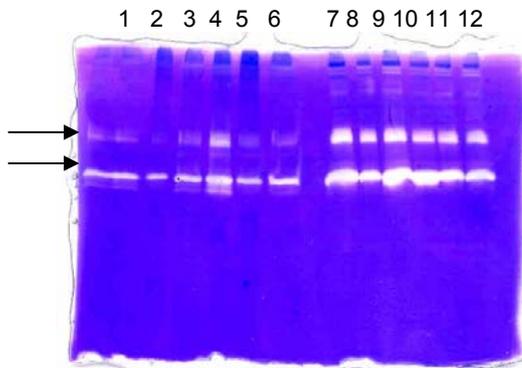


Fig. 31C – Análise da expressão de MMPs.

Gel de poliacrilamida a 12% e gelatina a 5%; corrida do gel a 80V e incubação do gel por 20h a 37°C em tampão de incubação. Coloração com Comassie Blue R-250 0,5% em ácido acético:álcool isopropílico:água (1:3:6).

Linhas 1 a 3: Meio de cultura (MC) condicionado tratado com EDTA.

1 – Células crescidas sobre o colágeno tipo I .

2 – Células crescidas sobre a ALT-C.

3- Células crescidas sobre o colágeno tipo I e acrescidas de ALT-C em suspensão (400nM).

Linhas 4 a 6: Extrato celular (EC) tratado com EDTA.

4 - Células crescidas sobre o colágeno tipo I .

5 – Células crescidas sobre a ALT-C.

6- Células crescidas sobre o colágeno tipo I e acrescidas de ALT-C em suspensão (400nM).

Linhas 7 a 9: MC sem EDTA.

7 – Células crescidas sobre o colágeno tipo I .

8 – Células crescidas sobre a ALT-C.

9 - Células crescidas sobre o colágeno tipo I e acrescidas de ALT-C em suspensão (400nM).

Linhas 10 a 12: EC sem EDTA.

10 – Células crescidas sobre o colágeno tipo I .

11 – Células crescidas sobre a ALT-C.

12- Células crescidas sobre o colágeno tipo I e acrescidas de ALT-C em suspensão (400nM).

13.10 Ensaio de inibição da adesão das células K562- $\alpha_2\beta_1$ ao Colágeno tipo I, mediado pelos peptídeos sintéticos *a* e *b*.

Como podemos observar na figura 32, os peptídeo *a* e *b* não possuem efeito inibitório da adesão das células K562- $\alpha_2\beta_1$ ao colágeno nas concentrações testadas. Estes peptídeos foram testados somente em células transfectadas com a integrina $\alpha_2\beta_1$, já que o objetivo era encontrar peptídeos sintéticos que mimetizassem a ação da ALT-C sobre a adesão destas células ao colágeno.

A análise estatística não revelou diferença significativa entre o controle positivo e os peptídeos *a* e *b*.

Peptídeo a) C-R-A-S-M-S-E-C-D-P-A-E-H-NH₂

PM – 1406,59

Peptídeo b) C-N-E-L-L-E-V-G-E-E-C-D-NH₂

PM – 1385,59

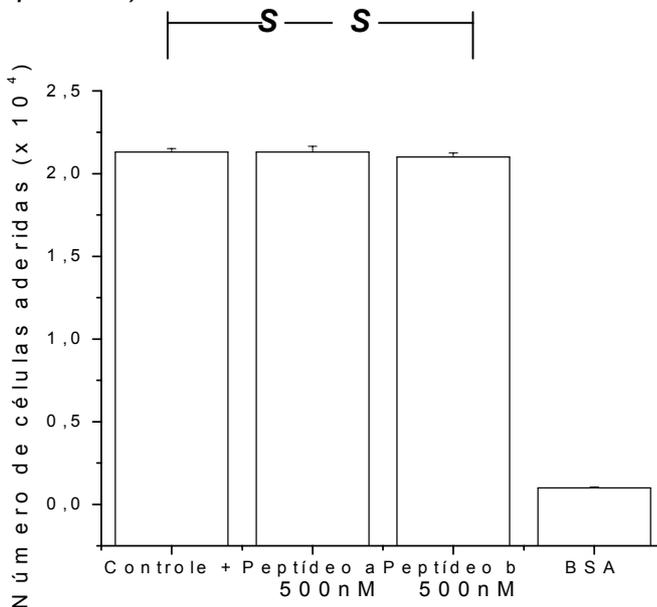


Fig.32 - Efeito dos peptídeos *a* e *b* sobre a inibição da adesão das células K562- $\alpha_2\beta_1$ ao colágeno tipo I. Colágeno tipo I (1 μ g/poço) em ácido acético 0,1% foi imobilizado "overnight" a 4°C em placa de 96 poços. Após bloqueio com BSA 1%, as células marcadas com CMFDA mais os peptídeos 1 e 2 (500nM/poço) foram semeadas nos poços. A placa foi então incubada a 37°C por 30 min. As barras de erro indicam o S.E. de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. *p < 0,05 foi usado como critérios de significância estatística (ANOVA/DUNNET).

A figura 33 mostra que mesmo em concentrações elevadas não houve diferenças significativas entre as células tratadas com o peptídeo a e as células sem tratamento. Foram realizados ensaios adicionais com o peptídeo a porque houve efeito modulador positivo deste peptídeo sobre a migração de neutrófilos (MARIANO-OLIVEIRA et al., 2003)

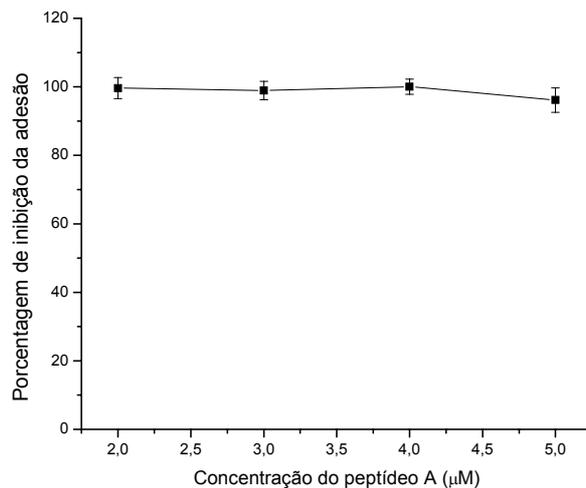


Fig.33 - Efeito do peptídeo a sobre a inibição da adesão das células K562- $\alpha_2\beta_1$ ao colágeno tipo I. Colágeno tipo I (1 µg/poço) foi imobilizado “overnight” a 4°C em placa de 96 poços. Após bloqueio com BSA 1%, as células marcadas com CMFDA mais o peptídeo a (2; 3; 4 e 5 µM/poço) foram semeadas nos poços. A placa foi então incubada a 37°C por 30 min. As barras de erro indicam o S.E. de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

Tabela 4- Efeitos da ALT-C sobre as diferentes linhagens celulares.

Células	Inibição	Promoção	Desadesão	Proliferação	Migração
	Adesão	Adesão			
HUVEC	nd	nd	-	+	nd
Neutrófilos	nd	nd	nd	nd	+
NITH3T3	+	+	-	-	nd
HeLa	+	+	-	-	nd
ECV-304	+	+	-	-	nd
MBA-MD-231	+	nd	nd	nd	+
MCF-7	-	nd	nd	nd	-
K562- $\alpha 2\beta 1$	+	+	-	-	nd

Nd –ensaio não realizado; + inibe; - não inibe

14 DISCUSSÃO

A progressão de células malignas acaba resultando em invasão e metástase. Estes processos envolvem várias etapas: separação de algumas células do tumor primário, penetração destas através da membrana basal, migração das células para dentro da MEC, extravasamento destas para os vasos sanguíneos, adesão das células tumorais ao endotélio dos vasos, extravasamento das células pelos capilares do órgão/tecido alvo e, finalmente, a formação dos tumores secundários. Durante estas etapas, a adesão celular obviamente é um evento crítico, desde que as células tumorais precisam interagir com as células normais que as circundam e também deve haver a interação das células tumorais com a MEC. Tais interações são mediadas por uma variedade grande de moléculas de adesão, incluindo as integrinas (McCORMICK et al., 1992; AKIYAMA et al., 1995).

Integrinas são heterodímeros que desempenham importante papel na manutenção normal das interações célula-célula e célula-MEC (ALBEDA, 1993). Em células tumorais, a expressão e a função das integrinas frequentemente está alterada, resultando no seu aumento no local da invasão e das metástases de células tumorais (JULIANO & VARNER, 1993).

Já foi demonstrado que a ALT-C, uma desintegrina-símile isolada de uma metalopeptidase do veneno de *Bothrops alternatus* é um ligante de um receptor de colágeno tipo I, a integrina $\alpha_2\beta_1$, inibindo a adesão celular mediada por esta integrina (SOUZA et al., 2000).

Através dos experimentos realizados, a ALT-C mostrou-se capaz de promover a adesão celular de linhagens tumorais e não-tumorais, tais como a HeLa, ECV 304 e MDA-MB-231 e a NITH3T3, as quais sabidamente expressam a integrina $\alpha_2\beta_1$. Por outro lado, a ALT-C inibiu a adesão destas linhagens ao colágeno tipo I com uma IC_{50} de 2,2 (NITH3T3), 1,66 (ECV-304), 1,38 (HeLa) e 0,95 μ M (MDA-MB-231), sugerindo que a integrina $\alpha_2\beta_1$ seja um importante receptor de colágeno tipo I nestas linhagens. Sendo assim, a ALT-C teoricamente poderia inibir a formação de tumores secundários, quando estes fossem formados por linhagens celulares de perfil migratório e invasivo;

Nos ensaios de migração celular, a ALT-C modulou de maneira dose-dependente a migração das células MDA-MB-231, mas somente em presença de colágeno tipo I. Em concentrações baixas, a ALT-C induziu a migração, enquanto que em altas concentrações a migração celular foi completamente abolida. A ALT-C não exerceu efeito algum sobre a migração e a adesão das células tumorais da linhagem MCF-7. A ausência de efeito já era esperada, pois a ALT-C tem especificidade para a integrina $\alpha_2\beta_1$, e esta linhagem tumoral ou não expressa a integrina $\alpha_2\beta_1$ e, se expressa, o faz em baixíssimos níveis, quando comparada à linhagem tumoral MDA-MB-231 (ROYAL, 1997).

A desadesão celular freqüentemente resulta em morte celular apoptótica, que ocorre pela perda do contato da célula com a matriz extracelular (EVAN, 2001), exceto para células transformadas que expressam oncogenes ativados Src e Ras. (FRISCH & FRANCIS, 1994). Aqui mostramos que a ALT-C não exerce efeito

algum sobre a desadesão das células N1H3T3, ECV-304 e HeLa, mesmo que elas sejam cultivadas sobre concentrações baixas de colágeno tipo I. O efeito sobre a desadesão celular só foi verificado na linhagem celular transfectada K562- $\alpha_2\beta_1$, e mesmo assim em concentração elevada (3,5 μ M). Este é um dado importante, pois se tratando de tumores malignos não é interessante que haja o desprendimento de células do tumor primário, já que isso poderia desencadear um possível início de metástase;

Em contraste, a BaG, uma metalopeptidase/desintegrina-símile isolada do veneno de *Bothrops alternatus*, foi capaz de desaderir significativamente e no mesmo tempo, as células da linhagem K562 quando estas já estavam aderidas à fibronectina (64%). A concentração utilizada tanto para o ensaio com a ALT-C quanto para o ensaio com a BaG foi a mesma (COMINETTI et al., 2003). Da mesma forma, a Echistatina, uma desintegrina RGD isolada do veneno de *Echis carinatus*, induziu uma significativa desadesão das células K562 já aderidas à fibronectina em concentrações bem baixas (10nM e 1 μ M) em um curto período de tempo (30 minutos) (GAN, 1988), e em experimento realizado sob as mesmas condições. Estes resultados mostram as diferenças significantes os tipos de desintegrinas quanto ao efeito e ao tipo de ligante. Lundström et al.,1998 demonstraram que as integrinas $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_3\beta_1$ desempenham um importante papel durante a adesão inicial das células de carcinoma mamário MDA-MB-231 à matriz óssea e pulmonar, para iniciar o processo de metastatização. Estes mesmos autores mostraram que as estruturas de superfície celular para mediar a

ancoragem desta linhagem tumoral eram formadas principalmente pelos receptores de colágeno tipo I, as integrinas $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_3\beta_1$. Diante disto chegou-se a correlação entre a expressão das integrinas $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_3\beta_1$ a habilidade de diferentes tipos de células tumorais se ligarem ao osso cortical. Além disso, um dos tipos mais comuns de câncer e um dos mais agressivos em mulheres é o câncer mamário, caracterizado por metástases ósseas e pulmonares, provavelmente devido às proteínas existentes na matriz vascular óssea e pulmonar. Propriedades intrínsecas da matriz óssea poderiam participar do desenvolvimento das metástases ósseas (MORINI et al., 2000). Entre as integrinas, o receptor de colágeno/laminina $\alpha_2\beta_1$ (VLA-2) e o receptor de fibronectina $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) têm sido apontados em modelos animais como sendo os responsáveis pelas metástases seletivas de células tumorais em ossos (LUNDSTRÖM et al., 1998). Já foi demonstrado *in vitro* e *in vivo* (LUNDSTRÖM et al., 1998) que as células MDA-MB-231 de carcinoma mamário têm preferência em metastatizar células ósseas. As integrinas VLA-2 ($\alpha_2\beta_1$) e VLA-3 ($\alpha_3\beta_1$) têm em comum a cadeia beta-1, que pode se ligar de forma não covalente a uma das seis diferentes cadeias alfa, o que irá determinar as propriedades ligantes do receptor (HEMLER et al., 1990).

Sendo o colágeno tipo I a principal proteína da MEC presente no tecido ósseo cortical, e a ALT-C capaz de inibir a adesão de células tumorais ao colágeno tipo I, o desenho de ferramentas terapêuticas para o estudo do câncer baseado na estrutura da ALT-C poderia vir a ser de grande interesse. É sabido que a formação de metástase por tumores sólidos é dependente da

neovascularização do tumor primário (ALBINI et al., 2000), e a terapia anti-angiogênica, ou seja, a utilização de substâncias que possam bloquear a formação de novos vasos tem sido alvo de intensas pesquisas e resultados muito animadores (GRIFFIOEN E MOLEMA, 2000). A primeira molécula identificada como fator angiogênico foi descrita em 1984 (SHING, 1984), e a primeira que exibiu efeitos inibitórios sobre o crescimento celular, com especificidade para as células endoteliais foi o o-cloroacetilcarbamoil fumagillol ou AGM-1470/TNP-470, um análogo do antibiótico fumagillin (INGBER et al., 1990). O mecanismo de ação deste composto era impedir que as células endoteliais entrassem na fase G₁ do ciclo celular, resultando numa diminuição da proliferação.

Atualmente existem muitas classes de substâncias que atuam nas diferentes etapas que envolvem a angiogênese. Estão disponíveis substâncias inibidoras de MMPs da MEC (MMPis), tais como o Marimastat, o Prinomastat, BMS275291, BAY12-9566 e o Neovastat, substâncias que bloqueiam a sinalização das células endoteliais via VEGF e seu receptor VEGFR que são o rhuMAb VEGF, SU5416, SU6668, ZD6474, CP-547, CP-632 e o ZD4190, drogas similares aos inibidores endógenos da angiogênese como a Endostatina, Angiostatina e os Interferons. A Talidomida também vem sendo revista quanto à sua aplicação não mais como anti-emético e sim como agente anti-metastático. D'Amato et al (1994) relataram que a Talidomida pode inibir a angiogênese induzida por bFGF e VEGF, inibir o Fator de Necrose Tumoral-alfa e a Cicloxigenase 2 (COX2), alterar a expressão da ICAM e modificar a MEC. Drogas como a Esqualamina, o Celecoxib, ZD6126, TNP-470 e antagonistas de

integrinas- α_v também já estão sendo avaliados quanto à aplicação na terapia anti-tumoral (SHEPERD E SRIDHAR, 2003). Ainda em relação à terapia anti-angiogênica, não só os diversos tipos de câncer podem ser tratados por estas drogas, mas sim uma gama muito maior de patologias, tais como: degeneração muscular relacionada à idade, cegueira causada pelo diabetes (retinopatia diabética), inflamações crônicas (artrite reumatóide, doença de Crohn), psoríase e em várias outras condições. Estima-se que pelo menos 184 milhões de pacientes possam se beneficiar com a terapia anti-angiogênica (GRIFFIOEN, e MOLEMA, 2000).

Baseado em experimentos *in vitro*, foi observado que a ALT-C exerceu efeito modulador sobre a proliferação e a migração celulares. Em neutrófilos, a ALT-C induz migração via sinalização de integrina com ativação da quinase de adesão focal (FAK), aumento da polimerização de F-actina e induz a translocação da Erk-2 para o núcleo da célula, atividade esta relacionada com sobrevivência (MARIANO-OLIVEIRA et al., 2003). Em presença do Colágeno tipo I, a ALT-C induziu de maneira significativa a migração das células MDA-MB-231. Uma hipótese para tal efeito seria a de que a presença do Colágeno tipo I ativaria a integrina $\alpha_2\beta_1$ ou aumentaria a sua expressão na superfície de algumas linhagens celulares, o que poderia tornar a célula mais susceptível a ALT-C. BYZOVA et al., 2000 mostraram que o VEGF ativa algumas integrinas envolvidas com a angiogênese e, conseqüentemente, modula a resposta migratória (BYZOVA et al., 2000).

A ALT-C, tanto na forma solúvel quanto na forma imobilizada ao plástico, demonstrou ser capaz de promover a proliferação celular em HUVECs, e este efeito poderia estar relacionado com um aumento da expressão de fatores de crescimento. Em células da linhagem NITH3T3, a ALT-C na forma solúvel induziu de forma significativa a expressão de VEGF (COMINETTI et al., 2004). O VEGF pertence a uma família de glicoproteínas homodiméricas e é, sobretudo, um potente fator de crescimento vascular que está relacionado com as desordens angiogênicas tais como o câncer, a isquemia e a inflamação (FERRARA & HENZEL, 1989; FERRARA et al., 1992; CARMELIET, 2003; CROSS et al., 2003). Além disso, o VEGF exerce outras funções nas células endoteliais, como indução da permeabilidade vascular (SENGER et al., 1983, 1990), sobrevivência celular (ALON et al., 1995; PIERCE et al., 1996; GERBER et al., 1998), estimulação da adesão e migração (BYZOVA et al., 2000; MARIANO-OLIVEIRA et al., 2003) e indução da expressão gênica (Senger, 2001).

A ALT-C também aumentou a expressão de outros fatores de crescimento, tais como IL-11, TGF β e EGR2 e 3, os quais provavelmente estão envolvidos no efeito positivo sobre a proliferação celular das HUVECs e outros tipos celulares (COMINETTI et al., 2004). Portanto, a ALT-C estaria agindo como um fator de sobrevivência. Não houve diferenças na expressão de metaloproteases em células NITH3T3 tratadas com ALT-C e com colágeno tipo I, sugerindo que a ALT-C poderia mimetizar os efeitos do colágeno tipo I, como sugerido por ZIGRINO et al. (2002).

Utilizando-se a técnica de microarrays, foi demonstrado que fibroblastos humanos incubados com ALT-C tiveram os níveis de expressão de VEGF aumentados (COMINETTI et al., 2004), o que poderia explicar a atividade indutora de proliferação da ALT-C em HUVECs. Além do VEGF, a ALT-C também aumentou o nível de expressão de 45 genes e diminuiu a expressão de 30 genes (COMINETTI et al., 2004)

Estes efeitos não são observados na maioria das desintegrinas-RGD, que inibem a angiogênese e induzem a apoptose (Hong, S.Y. *et al.*, 2003; Yeh, C.H. *et al.*, 1998). A ALT-C não mostrou efeito proliferativo para as linhagens celulares estudadas. Estes resultados mostram que há diferença entre as HUVECs e as linhagens testadas, já que para as células endoteliais a ALT-C teve um forte efeito indutor de proliferação em baixas concentrações (5nM), sendo que em concentrações mais elevadas o efeito proliferativo diminuiu. Diante do exposto e dos resultados obtidos até o momento com a ALT-C, é inegável o potencial terapêutico desta desintegrina-símile senão como próprio fármaco, sim como modelo para o desenho de drogas e de modelos para o estudo de terapias anti-angiogênicas.

Quanto ao peptídeo sintético **a**, mesmo em concentrações mais elevadas não foi capaz de inibir a adesão das células K562- $\alpha_2\beta_1$ de forma significativa, sugerindo que a atividade inibitória estaria relacionada à conformação da molécula da ALT-C, daí a ineficiência do peptídeo sintético. Por outro lado, em neutrófilos

este mesmo peptídeo reproduziu as ações da ALT-C, induzindo a migração destes (MARIANO-OLIVEIRA et al., 2003).

15 CONCLUSÕES

Frente aos resultados obtidos dentro deste projeto de pesquisa, podemos concluir que:

- A ALT-C é capaz de inibir a adesão de diversas linhagens celulares tumorais ao colágeno tipo I, quando estes processos envolvem a integrina $\alpha_2\beta_1$;
- A ALT-C não é capaz de induzir a desadesão das linhagens celulares estudadas, uma vez estando estas aderidas ao seu substrato;
- A ALT-C não é citotóxica para as células não tumorais, requisito importante para viabilizar futuros estudos *in vivo*;
- A ALT-C induz a proliferação de HUVECs em baixas concentrações e não induz a proliferação das outras linhagens celulares estudadas;
- A ALT-C demonstrou possuir especificidade para HUVECs;
- A ALT-C produz seus efeitos de maneira dose-dependente, ou seja, é possível modular a concentração para se obter o efeito desejado.

16 PERSPECTIVAS

As perspectivas em relação ao potencial da ALT-C são muitas, mas alguns pontos devem ser levados em consideração:

- Como toda substância de origem animal, o potencial imunogênico é grande; a obtenção desta proteína através da tecnologia do DNA recombinante talvez sanasse este possível problema e também eliminaria a questão da produção da ALT-C em larga escala;
- Devem ser realizados ainda ensaios *in vivo* para a confirmação dos resultados que foram obtidos *in vitro*, pois o sistema biológico, além de muito complexo, nem sempre corresponde de maneira semelhante aos ensaios *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, A. A terra santa e a origem das serpentes. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 27, n. 160, p. 11-12, 2000.
- AKIYAMA, S. K.; OLDEN, K.; YAMADA, K. M. Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. **Cancer Metast. Rev.**, v. 14, p. 173-189, 1995.
- ALBEDA, S.M. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis, **Lab. Invest**, v. 6, p. 4-17, 1993.
- ALBINI, A.; MARCHISONE, C.; DEL GROSSO, F.; BENELLI, R.; MASIELLO, L.; TACCHETTI, C.; BONO, M.; FERRANTINI, M.; ROZERA, C.; TRUINI, M.; BELARDELLI, F.; SANTI, L.; NOONAN, D. M. Inhibition of angiogenesis and vascular tumor growth by Interferon-producing cells. **Am. J. Pathol.**, v. 156, n. 4, p. 1381-1393, 2000.
- ALON, T.; HEMO, I.; ITIN, A.; PE'ER, J.; STONE, J.; KESHET, E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. **Nat. Med.**, v. 1, p. 1024-1028, 1995.
- BARAMOVA, E. N.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. **Arch Biochem. Biophys.**, v.275, p. 63-71, 1989.
- BERGERS, G.; BREKKEN, R.; McMAHON, G.; VU, T. H.; ITOH, T.; TAMAKI, K.; TANZAWA, K.; THORPE, P.; ITOHARA, S.; WERB, Z.; HANAHAN, D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. **Nat. Cell. Biol.**, v. 2, p. 737-744, 2000.

- BEVIGLIA, L.; STEWART, G. J.; NIEWIAROWSKI, S. effect of four disintegrins on the adhesive and metastatic properties of B16F10 melanoma cells in a murine model. **Oncol. Res.**, v. 7, n. 1, p. 7-20, 1995.
- BJARNASON, J. B.N.; FOX, J. W. Haemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.**, v.62, p. 325-372, 1994.
- BLACK, R. A.; WHITE, J. M. ADAMs: focus on the protease domain. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 10, p.654-659, 1998.
- BODE, W.; FERNANDEZ-CATALAN, C.; TSCHESCHE, H.; GRAMS, F.; NAGASE, H.; MASKOS, K. Structural properties of matrix metalloproteinases. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 55, p. 639-652, 1999.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p. 248-252, 1976.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Brasília, 3 ed., 2001. 112p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Centro Nacional de epidemiologia. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, 4 ed., 1998. 523p.
- BRUMMENDORF ,T.; RATHJEN, F. G. Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. **Protein Profile**, v.2, n.9, p.963-1108, 1995.

- BYZOVA, V.T.; GOLDMAN, K. C.; PAMPORI, N.; THOMAZ, A. K.; BETT, A.; SHATTIL, J. S.; PLOW, F. E. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. **Mol. Cell Biol**, v.6, p.851-860, 2001.
- BORGES, R. C. **Serpentes peconhentas brasileiras : manual de identificação, prevenção e procedimentos em casos de acidentes**. Sao Paulo : Ed. Atheneu, 1999. 148 p.
- CARMELIET, P.; NG, Y. S.; NUYENS, D.; THEILMEIER, G.; BRUSSELMANS, K.; CORNELISSEN, I.; EHLER, E.; KAKKAR, V. V.; STALMANS, I.; MATTOT, V.; PERRIARD, J. C.; DEWERCHIN, M.; FLAMENG, W.; NAGY, A.; LUPU, F.; MOONS, L.; COLLEN, D.; D'AMORE, P. A.; SHIMA, D. T. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF 188. **Nat. Med.**, v. 5, p. 495-502, 1999.
- CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends Cell Biol.**, v. 11, p. 37-43, 2001.
- CHEN, H.; SAMPSON, N. S. Mediation of sperm-egg fusion: evidence that mouse egg alpha6beta1 integrin is the receptor for sperm fertilin beta. **Chem. Biol.** V. 6, p. 1-10, 1999.
- CHIANG, H. S.; YANG, R. S.; HUANG, T. F. The Arg-Gly-Asp-containing peptide, rhodostomin, inhibits in vitro cell adhesion to extracellular matrices and platelet aggregation caused by saos-2 human osteosarcoma cells. **Br. J. Cancer**, v. 71, n. 2, p. 265-270, 1995.

- CHINTALA, S. K.; Sawaya, R.; Gokaslan, Z. L.; Rao, J. S. Modulation of matrix metalloprotease-2 and invasion in human glioma cells by $\alpha 3\beta 1$ integrin. **Cancer Lett.**, v. 103, p. 201-208, 1996.
- CHO, C.; BUNCH, D. O.; FAURE, J. E.; GOULDING, E. H.; EDDY, E. M.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. **Science**, v. 18, n. 5384, p. 1857-1859, 1998.
- COELHO, A. L. J.; DE FREITAS, M. S.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; MOURA-NETO, V.; ZINGALI, R. B.; BRAJA-FIDALGO, C. Effects of jarastatin, a novel snake venom disintegrin, on neutrophil migration and actin cytoskeleton dynamics. **Exp. Cell Res.**, v. 251, p. 379-387, 1999.
- COMINETTI, M.R.; TERRUGGI, C. H. B.; RAMOS, O. H. P.; FOX, J. W.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; DE FREITAS, M. S.; FIGUEIREDO, C. C.; MORANDI, V.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. 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.
- COMINETTI, M.R.; RIBEIRO, J. U.; FOX, J. W.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from the *Bothrops alternatus* snake venom that interacts with $\alpha 5\beta 1$ integrin, **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 416, p. 171-179, 2003.
- CROSS, M. J.; DIXELIUS, J.; MATSUMOTO, T.; CLAESSION-WELSH, L. VEGF-receptor signal transduction. **Trends Biochem. Sci.**, v. 28, n. 9, p. 488-494, 2003.

- CURRAN, S.; MURRAY, G. I. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. **Eur. J. Cancer**, v. 36, p. 1621-1630, 2000.
- CUZNER, M. L.; OPDENAKKER, G. Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system. **J. Neuroimmunol.**, v. 94, p. 1-14, 1999.
- D'AMATO R. J.; Loughnan, M. S.; Flynn, E.; Folkman, J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, n.9, p.4082-4085,1994.
- DARREN, F. S.; COURTNEIDGE, S. A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes Dev.**, v. 17, p. 7-30, 2003.
- DECLERCK, Y. A. Interactions between tumor cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. **Eur. J. Cancer.**, v. 36, p. 1258-1268, 2000.
- DENNIS, M. S.; HENZE, L. W. J.; PITTI, R. M. Platelet glycoprotein lib-IIIa protein antagonists from snake venom: evidence for a family of platelet-aggregation inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 2471-2475, 1990.
- ENGVALL, E.; JONSON, K; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 251, p. 427-434, 1971.

ENGVALL, E.; PERLMAN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, p. 871-874, 1971.

ESCALA RURAL especial serpentes. São Paulo: Editora Escala, v. 25, 2004.

ETO, K. W.; PUZON-MCLAUGHLIN, W.; SHEPPARD, D.; SEHARA-FUJISAWA, A.; ZHANG, X.; TAKADA, Y. RGD-independent binding of integrin $\alpha 9\beta 1$ to the ADAM-12 and-15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 34922-34930, 2000.

EVAN, G.I.; VOUSDEN, K.H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v.411, 342-348, 2001.

EUBANK, T. D.; GALLOWAY, M.; MONTAGUE, C. M.; WALDMAN, W. J.; MARSH, C. B. M-CSF Induces Vascular Endothelial Growth Factor Production and Angiogenic Activity From Human Monocytes. **J. Immunol.**, v. 171, n. 5, p. 2637 – 2643, 2003.

FERRARA, N.; HENZEL, W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 161, p.851-858, 1989.

FERRARA, N.; HOUCK, K.; JAKEMAN, L.; LEUNG, D. W. Molecular and biological properties of the VEGF family of proteins. **Endocr. Rev.**, v. 13, p. 18-32, 1992.

FERRARA, N.; ALITALO, K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. **Nat Med.**, v.5, p.1359-1364, 1999.

FISHMAN, D. A.; KEARNS, A.; CHILUKURI, K.; BAFETTI, L. M.; O'TOOLE, E. A.; GEORGACOPOULOS, J.; RAVOSA, M. J.; STACK, M. S. Metastatic dissemination of human ovarian epithelial carcinoma is promoted by alpha2beta1-integrin-mediated interaction with type I collagen. **Invasion Metastasis**, v.18, n. 1, p. 15-26, 1998.

FRISCH, S. M.; FRANCIS, H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. **J. Cell Biol.**, v. 124, p. 619-626, 1994.

FUJIMURA, Y.; IKEDA, Y.; MIURA, S.; YOSHIDA, E.; SHIMA, H.; NISHIDA, S.; SUSUKI, M.; TITANI, K.; TANIUCHI, Y.; KAWASAKI, T. Purification and characterization of a non-haemorrhagic metalloproteinase from *Agkistrodon halys brevicaudus* venom. **Thromb. Haemost.**, v. 74, p. 743-750, 1995.

GAN, Z.R.; GOULD, R. J.; JACOBS, J. W.; FRIEDMAN, P. A.; POLOKOFF, M. A. Echistatin. A potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper, *Echis carinatus*. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 19827-19832, 1988.

GEIGER, B.; BERSHADSKY, A.; PANKOV, R.; YAMADA, K. M. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. **Nat. Rev. Cell Biol.**, v. 2, p. 793-805, 2001.

GERBER, H. P.; MCMURTREY, A.; KOWALSKI, J.; YAN, M.; KEYT, B. A.; DIXIT, V.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3' kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 22128-22135, 1998.

GILPIN, B. J.; LOECHEL, F.; MATTEI, M. G.; ENGVALL, E.; ALBRECHTSEN, R.; WEWER, U. M. A novel, secreted form of human ADAM 12 (Meltrin α 1) provokes myogenesis in vivo. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 1, p. 157-166, 1998.

GOOD, D. J.; POLVERINI, P. J.; RASTINEJAD, F.; BEAU, M. M. L.; LEMONS, R. S.; FRAZIER, W. A.; BOUCK, N. P. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 6624-6628, 1990.

GRIFFIOEN, A. W.; MOLEMA, G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. **Pharmac. Rev.** v. 52, p. 237-267, 2000.

GUAN, A. L.; RETZIOS, A. D.; HENDERSON, G. N.; MARKLAND, F. S. Jr. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from venom of the southern copperhead snake *Agkistrodon contortrix contortrix*, **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 289, p.197-207, 1991.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v.86, p. 353-364, 1996.

HANDBOOK OF PROTEOLYTIC ENZYMES. Barret, A. J.; Rawlings, N. D.; Woessner, J. F. (eds),. Academic Press, London , 1998, p. 1180-1183.

HAY, E.D. An overview of epitheliomesenchymal transformation. **Acta Anafornica**, v. 154, p. 6-20,1995.

HEMLER, M. E.; ELICES, M. J.; CHAN, B. M.; ZETTER, B.; MATSUURA, N.; TAKADA, Y. Multiple ligand binding functions for VLA-2 (alpha 2 beta 1) and

VLA-3 (alpha 3 beta 1) in the integrin family. **Cell Differ. Dev.**, v. 32, n. 3, p. 229-238, 1990.

HITE, L.A.; JIA, L. G.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. cDNA sequence for four snake venom metalloproteinases: structure, classification and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 308, p. 182 -191, 1994.

HONG S. Y.; LEE H.; YOU, W. K.; CHUNG, K. H.; KIM, D. S.; SONG, K. The snake venom disintegrin salmosin induces apoptosis by disassembly of focal adhesions in bovine capillary endothelial cells. **Biochem. and Biophys. Res. Commun.**, v. 302, p. 502-508, 2003.

HONG S.Y.; KOH Y. S.; CHUNG K. H.; KIM, D. S.; KIM, D. Snake venom disintegrin, saxatilin, inhibits platelet aggregation, human umbilical vein endothelial cell proliferation, and smooth muscle cell migration. **Thrombosis Res.**, v. 105, p. 79-86, 2002.

HORIUCHI, K.; WESKAMP, G.; LUM, L.; HAMMES, H. P.; CAI, H.; BRODIE, T. A.; LUDWIG, T.; CHIUSAROLI, R.; BARON, R.; PREISSNER, K. T.; MANOVA, K.; BLOBEL, C. P. Potential role for ADAM 15 in pathological neovascularization in mice. **Mol. Cel. Biol.**, v. 23, n. 16, p. 5614-5624, 2003.

HUANG, T. F.; NIEWIAROWSKI, S. Disintegrins: the naturally-occurring antagonists of platelet fibrinogen receptor. **J. Toxicol.**, v. 13, n. 3, p. 253-273, 1994.

HUANG, T. F. What have snakes taught us about integrins? **Cell Mol. Life Sci**, v.54, p. 527-540, 1998.

HYNES, R. O., Integrins: a family of cell surface receptors, **Cell**, v. 48, n.4, p. 549-54, 1987.

HYNES, O. R. Millenium Issue - Cell adhesion: old and new questions. **Trends in Genetics**, v. 15, n. 12, p. M33, 1999.

IBA, K.; ALBRECHTSEN, R.; GILPIN, B. J.; LOECHEL, F.; WEWER, U. M. Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (Meltrin α) supports tumor cell adhesion. **Am. J. of Pathol.**, v. 154, p. 1489-1501, 1999.

IMAMURA, T.; Oka, S.; Tanahashi, T.; Okita, Y. Cell cycle-dependent nuclear localization of exogenously added fibroblast growth factor-1 in BALB/cT3 and human vascular endotelial cells. **Exp. Cell Res.**, v. 215, p. 363-372, 1994.

INGBER, D.; FUJITA, T.; KISHIMOTO, S.; SUDO, K.; KANAMARU, T.; BREM, H.; FOLKAN, J. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. **Nature**, v. 348, p. 555-557, 1990.

IVASKA, J.; HEINO, J. Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of an integrin-guided degradation of extracellular matrix. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 57, p. 16-24, 2000.

JACOB, M. P. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. **Biomed. e Pharm.**, v. 57, p. 195-202, 2003.

JIA, L. G.; WANG, X. M.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. D.; FOX, J. W.

- Function of disintegrin-like/cysteine-rich domains of Atrolysin A. Inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 13094-13102, 1997.
- JIA, L.G.; Wang , X.M; Shannon, J. D.; Bjarnason, J. B.; Fox, J. W. Inhibition of platelet aggregation by the recombinant cysteine-rich domain of the hemorrhagic snake venom metalloproteinase, atrolysin **A. Arch. Biochem. Biophys.**, v. **373**, p. 281-286, 2000.
- JOHNSON, E. K.; OWNBY, C. L. Isolation of a hemorrhagic toxin from the venom of *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broad-banded copperhead) and pathogenesis of the hemorrhage induced by toxin in mice. **Int. J. Biochem.**, v. 25, p. 267-278, 1993.
- JULIANO, R.L.; VARNER, J.A. Adhesion molecules in cancer: the role of integrins, **Curr.Opin.Cell Biol**, v. 5, n..5, p. 812-18, 1993.
- KAMIGUTI, A. S.; ZUZEL, M.; THEAKSTON, R. D. Insights into mechanism of haemorrhagic caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v.34, p. 627-642, 1996.
- KANDA, S.; HODGKIN, M. N.; WOODFIELD, R. J.; WAKELAM, M. J. O.; THOMAS, G.; CLAESSEON-WELSH, L. Phosphatidylinositol 3'-kinase-independent P70 S6 kinase activation by fibroblast growth factor receptor-1 is important for proliferation but not differentiation of endothelial cells. **J. Biol. Chem**, v. 272, p. 23347-23353, 1997.
- KANG, I. C.; LEE, Y. D.; KIM, D. S. A novel disintegrin salmosin inhibits tumor angiogenesis. **Cancer Res.**, v. 59, p. 3754-3760, 1999.

KANG, I. C.; KANG I. C., KIM D. S., JANG Y. S., CHUNG, K. H. Supressive mechanism of salmosin, a novel disintegrin in B16 melanoma cell metastasis. **Biochem Biophys. Res. Commun**, v.275, p. 169-173, 2000.

KLEIN, S.; ROGHANI, M; RIFKIN, D. B. Fibroblasts growth factors as angiogenesis factors: new insights into their mechanism of action. **EXS**, v.79, p.159-192, 1997.

KLENKLER, B.; SHEARDOWN, H. Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. **Exp. Eye Res.**, v. 79, n. 5, p. 677-688, 2004.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. Inhibition of platelet aggregation by a fibrinogenase from naja nigricollis venom is independent of fibrinogen degradation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1095, p. 117-121, 1991.

KNUDSEN, K. A.; TUSZYNSKY, G. P.,; HUANG, T. F.; NIEWIAROWSKI, S. Trigramin, an RGD-containing peptide from snake venom, inhibits cell-substratum adhesion of human melanoma cells. **Exp. Cell Res.**, v. 179, p. 42-49, 1988.

KOCH, A. W.; BOZIC, D.; PERTZ, O.; ENGEL, J. Homophilic adhesion by caderins. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 9, p. 275-281.

KOLBER, D. L.; KNISELY, T. L.; MAIONE, T. E. Inhibition of development of murine melanoma lung metastases by systemic administration of recombinant platelet factor 4. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 87, p. 304-309, 1995.

- KUNO, K.; TERASHIMA, Y.; MATSUSHIMA, K. ADAMTS-1 an active metalloproteinase associated with the extracellular matrix. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 18821-18826, 1999.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAFLEUR, M.A; FORSYTH, P. A.; ATKINSON, S. J.; MURPHY, G.; EDWARDS, D. R. Perivascular cells regulate endothelial membrane type-1 matrix metalloproteinase activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.282, p. 463-473, 2001.
- LASKY, L. A. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. **Science**, v. 258, p. 964-969, 1992.
- LÖSTER, K.; R. HORSTKORTE. Enzymatic quantification of cell-cell and cell-matrix adhesion: Peroxidase as a cellular label. **Micron.**, v. 31, p. 41-53, 2000.
- LUNDSTRÖM, A.; HOLMBOM, J.; LINDQVIST, C.; NORDSTRÖM, T. The role of $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ integrin receptors in the initial anchoring of MDA-MB-231 human breast cancer cells to cortical bone matrix, **Biochem. and Biophys. Res. Commun**, v.250, p.735-740, 1998.
- MANN, B. K.; SCHMEDLEN, R. H.; WEST, J. L. Tethered-TGF-beta increases extracellular matrix production of vascular smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 22, p. 439-444, 2001.
- MARIANO-OLIVEIRA, A.; COELHO, A. L.; TERRUGGI, C. H. B.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; BARJA-FIDALGO, C.; FREITAS, M. S. Alternagin-C, a non-

RGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling, **Eur. J. Biochem**, v. 270, p. 4799-4808, 2003.

MARTIN, J.; EYNSTONE, L. V.; DAVIES, M.; WILLIAMS, J. D.; STEADMAN, R. The Role of ADAM 15 in Glomerular Mesangial Cell Migration. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 37, p. 33683–33689, 2002.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting haemostasis and thrombosis. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1477, p. 146-156, 2000.

MATSUMOTO, T.; CLAEISSON-WELSH, L. VEGF receptor signal transduction. **Sci STKE**, v.112, p. RE21,2001.

McCORMICK, B. A.; ZETTER, B. R. Adhesive interactions in angiogenesis and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. **Cell**, v. 64, p. 327-336, 1992.

MCLANE, M. A.; MARCINKIEWICZ, C.; VIJAY-KUMAR, S.; WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I.; NIEWIAROWSKI, S. 1998.Viper venom disintegrins and related molecules. **Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 219, p. 109-119, 1998.

MEREDITH, J. E.; SCHWARTZ, M. A. Integrins, adhesion and apoptosis. **Trends Cell Biol.**, v. 7, p. 146-150, 1997.

MITJANS, F.; SANDER, D.; ADAN, J.; SUTTER, A.; MARTINEZ, J. M.; JAGGLE, C. S.; MOYANO, J. M.; KREYSCH, H. G.; PIULATS, J.; GOODMAN, S. L. An anti-alpha v-integrin antibody that blocks integrin function inhibits the

development of a human melanoma in nude mice, **J.Cell Sci**, v. 108, p. 2825-38, 1995.

MORGUNOVA, E., TUUTTILA, A.; BERGAMANN, U.; ISUPOV, M.; LINDQVIST, Y.; SCHENEIDER, G.; TRYGGVASON, K. Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. **Science**, v. 284, p. 1667-1670, 1999.

MORINI, M.; MOTTOLESE, M.; FERRARI, N.; GHIORZO, F.; BUGLIONI, S.; MORTARINI, R.; NOONAN, D. M.; NATALI, G. P.; ALBINI, A. The $\alpha 3\beta 1$ integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (MMP-9) activity. **Int. J. Cancer**, v. 87, p. 336-342, 2000.

MYLES, D.G.; KIMMEL, L. H.; BLOBEL, C. P.; WHITE, J. M.; PRIMAKOFF, P. Identification of a binding site in the disintegrin domain of fertilin required for sperm-egg fusion, **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.** v. 91, n. 10, p. 4195-98, 1994.

NAGASE, H.; WOESSNER JR., F. Matrix metalloproteinases. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 31, p.21491-21494, 1999.

NIEWIAROWSKI, S.; MCLANE, M.A.; KLOCZEWIAK, M.; STEWART, G. J. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Sem. Hematol.**, v.31, p. 289-300, 1994.

PETRUZZELLI, L.; TAKAMI, M.; HUMES, H. D. Structure and function of cell adhesion molecules. **Am. J. Med.**, v. 106, n. 4, p. 467-476, 1999.

PHILLIPS, D. R.; CHARO, I. F.; SCARBOROUGH, R. M. GPIIb-IIIa: the responsive integrin. **Cell**, v. 65, n.3, p. 359-362, 1991.

- PIERCE, E. A.; FOLEY, E. D.; SMITH, L. E. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. **Arch. Ophthalmol.**, v. 114, p. 1219-1228, 1996.
- PRUIJT, J. F. M.; FIBBE, W. E.; LATERVEER, L.; PIETERS, R. A.; LINDLEY, I. J. D.; PAEMEN, L.; MASURE, S.; WILLEMZE, R.; OPDENAKKER, G. Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the metalloproteinase gelatinase B (MMP-9). **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 96, p. 10863-10868, 1999.
- RITTER, M. R.; MARKLAND, F. S. Jr. Differential regulation of tyrosine phosphorylation in tumor cells by contortrostatin, a homodimeric disintegrin, and monomeric disintegrins echistatin and flavoridin. **Toxicon**, v. 39, p. 283-289, 2001.
- SACCO, P. A.; MCGRANAHAN, T. M.; WHEELLOCK, M. J.; JOHNSON, K. R. Identification of Plakoglobin Domains Required for Association with N-cadherin and b-Catenin. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 34, p. 20201-20206, 1995.
- SANTIAGO, C.; FREIJE, J. M. P.; LÓPEZ, J. M.; TAKADA, Y.; LÓPEZ-OTÍN, C. ADAM 23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the $\alpha v\beta 3$ integrin through an RGD-independent mechanism. **Mol. Biol. Cell**, v. 11, p. 1457-1469, 2000.
- SASTRY, S. K.; BURRIDGE, K. Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. **Exp. Cell Res.**, v. 261, p. 25-36, 2000.
- SCARBOROUGH, R. M.; ROSE, J.W.; HSU, M. A.; PHILLIPS, D. R.; FRIED, V. A.; CAMPBELL, A. M.; NANNIZZI, L.; CHARO, I. F. Barbourin: a GPIIb/IIIa

specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus barbouri*. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 9359-9362, 1991.

SCOTTILE, J. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1654, p.13-22, 2003.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; SOUZA, D. H.; OWNBY, C. L. Analysis of a cDNA sequence encoding a novel member of the snake venom metalloproteinase, disintegrin-like, cysteine-rich (MDC) protein family from *Agkistrodon contortrix laticinctus*. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 1342, n. 2, p. 109-115, 1997.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; QUEIROZ, L. S.; CUNHA, O. A. B.; SOUZA, G. E. P.; GIGLIOJ, R. Isolation And Characterization Of Hemorrhagic, Myonecrotic, and Edema Inducing Toxins From *Bothrops Insularis* (Jararaca Ilhoa) Snake Venom. **Toxicon**. v.28, p.262 - 273, 1990.

SELISTRE, H. S.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) **Toxicon**, v. 25, p. 1135- 1144, 1987.

SENGER D. R.; CONNOLLY, D. T.; VAN DE WATER, L.; FEDER, J.; DVORAK, H. F. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. **Cancer Res.**, v. 50, p.1774-1778, 1990.

SENGER, D. R. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor: multiple biological activities for promoting angiogenesis. **Tumor Angiogenesis and Microcirculation**. Ed. E. E. Voest, P. A. D' Amore. New York, Marcel Dekker, Inc., 2001, p. 167-184.

- SERRANO, S. M. T.; REINHARDT, M.; SAMPAIO, C. A. M.; FINK, E. Purification, characterization and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 34, p.7186-7193,1995.
- SHATTIL, S. J.; KASHIWAGI, H.; PAMPORI, N. Integrin Signaling: The Platelet Paradigm. **Blood**, v. 91, p. 2645-2657, 1998.
- SHEPERD, F. A.; SRIDHAR, S. Targeting angiogenesis: a review of angiogenesis inhibitors in the treatment of lung cancer. **Lung Cancer**, v. 42, p. S81-S91, 2003.*
- SHEU, J. R.; TENG, C. M.; HUANG, T. Triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing antiplatelet peptide inhibits cell-substratum adhesion and melanoma cell-induced lung colonization. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 83, p. 885-893, 1992.
- SHEU, J. R.; LIN, C. H.; HUANG, T. F. Triflavin, an antiplatelet peptide, inhibits tumor cell-extracellular matrix adhesion through an arginine-glycine-aspartic acid-dependent mechanism. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 123, n. 2, p. 256-263, 1994.
- SHEU, J. R.; HUANG, T. F. Ex-vivo and in-vivo antithrombotic effect of triflavin, an RGD-containing peptide. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 46, n. 1, p. 58-62, 1994.
- SHING, Y.; FOLKMAN, J.; SULLIVAN, R.; BUTTERFIELD, C.; MURRAY, J.; KLAGSBRUN, N. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. **Science (Wash DC)**, v. 223, p. 1296-1299, 1984.

- SOSKA, T.; KNUDSEN, K. A.; BEVIGLIA, L.; ROSSI, C.; POGGI, A.; NIEWIAROWSKI, S. Inhibition of murine melanoma cell-matrix adhesion and experimental metastasis by albolabrin, an RGD-containing peptide isolated from the venom of *Trimeresurus albolabris*. **Exp. Cell Res.**, v. 196, p. 6-12, 1991.
- SOUZA, D. H.; IEMMA, M. R. C.; FERREIRA, L. L.; FARIA, J. P.; OLIVA, M. L.; ZINGALI, R. B.; NIEWIAROWSKI, S.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease inhibits $\alpha 2\beta 1$ integrin-mediated cell adhesion, **Arch.Biochem.Biophys**, v. 384, n..2, p. 341-350, 2000.
- SPRINGER, T. A. Adhesion receptors of the immune system, **Nature**, v. 346, n. 6283, p. 425-434, 1990.
- SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm **Cell**, v.76, p. 301-314, 1994.
- STAIANO, N.; DELLA-MORTE, R.; DI DOMENICO, C.; TAFURI, S.; SQUILLACIOTI, C.; BELISARIO, M. A.; DI NATALE, P. ECHISTATIN induces decrease of pp125FAK phosphorylation, disassembly of actin cytoskeleton and focal adhesions, and detachment of fibronectin-adherent melanoma cells. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 73, p. 298-305, 1997.
- STERNLICHT, M.D.; WERB, Z. How metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v.17, p. 462-516, 2001.

STOCKER, W.; GRAMS, F.; BAUMANN, U.; REINEMER, P.; GOMIS-RUTH, F. X.; McKAY, D. B.; BODE, W. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Sci.**, v.4, n.5, p.823-840, 1995.

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

TAKEICHI, M.; NAKAGAWA, S.; AONO, S.; USUI, T.; UEMURA, T. Patterning of cell assemblies regulated by adhesion receptors of the caderin superfamily. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.**, v. 355, p. 885-890, 2000.

TCHERNOV, E.; RIEPPEL, O.; ZAHER, H.; POLCYN, M. J.; JACOBS, L. L. et al. A fossil snake with limbs. **Science**, v. 287, p. 2010-2012, 2000.

TONINI, T.; ROSSI, F.; CLAUDIO, P.P. Molecular basis of angiogenesis and cancer. **Oncogene**, v. 22, p. 6549-6565, 2003.

TORTORELLA, M. D.; BURN, T. C.; PRATTA, M. A.; ABBASZADE, I.; HOLLIS, J. M.; LIU, R.; ROSENFELD, S. A.; COPELAND, R. A.; DECICCO, C. P.; WYNN, R.; ROCKWELL, A.; YANG, F.; DUKE, J. L.; SOLOMON, K.; GEORGE, H.; BRUCKNER, R.; NAGASE, H.; ITOH, Y.; ELLIS, D. M.; ROSS, H.; WISWALL, B. H.; MURPHY, K.; HILLMAN, M. C. Jr.; HOLLIS, G. F.; ARNER, E. C. Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. **Science**, v. 284, p. 1664-1666, 1999.

TRIKHA, M.; SCHMITMEIER, S.; MARKLAND, F.S. Purification and characterization of fibrolase isoforms from venom of individual southern

copperhead (*Agkistrodon contortrix contortrix*) snakes. **Toxicon**, v. **32**, p. 1521- 1531,1994.

VAN-DEN-STEEN, P. E.; OPDENAKKER, G.; WORLMALD, M. R.; DWEK, R. A.; RUDD, P. M. Matriz remodelling enzymes, the protease cascade and glycosylation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1528, p. 61-73, 2001.

VESTWEBER, D.; BLANKS, J. E. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. **Physiol. Rev.**, v. 79, p. 181-213, 1999.

WAGNER, G.; WISS, D. F. Cell surface adhesion receptors. **Curr. Op. Struct. Biol.**, v. 4, p.841-851, 1994.

WEBER, K. OSBORN, M. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 4406-4412.

WERB, Z.; YAN, Y. Enhanced: A Cellular Striptease Act. **Science**, v. 282, n. 5392, p. 1279-1280, 1998.

WERR, J.; ERIKSSON, E.; HEDQVIST, P.;LINDBOM, L..Integrin $\alpha 2\beta 1$ (VLA-2) is a principal receptor used by neutrophils for locomotion in extravascular tissue. **Blood**, v. 95, n. 5, p.1804-1809, 2000.

WOLFSBERG, T.G.; PRIMAKOFF, P.; WHITE, J. M. ADAM, a novel family of membrane proteins containing a disintegrin and metalloprotease domain: multipotential functions in cell-adhesion and cell-matrix interactions. **J. Cell Biol.**, v. 131, p. 275-278, 1995.

- WOLFSBERG, T. G.; WHITE, J. M. ADAMs in fertilization and development. **Dev Biol**, v. 180, p. 389-401, 1996.
- YEH, C. H.; PENG, H. C.; HUANG, T. F. Accutin, a new disintegrin, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo by acting as integrin $\alpha v \beta 3$ antagonist and inducing apoptosis. **Blood**, v.92, p. 3268-3276, 1998.
- YEH, R. H.; YAN, X.; CAMMER, M.; BRESNICK, A. R.; LAWRENCE, D. R. Real Time Visualization of Protein Kinase Activity in Living Cells. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 13, p. 11527-11532, 2002.
- YU, Q.; STAMENKOVIC, I. Angiopoietin-2 is implicated in the regulation of tumor angiogenesis. **Am. J. Pathol.**, v. 158, p. 563-570, 2001.
- ZHOU, Q.; SHERWIN, R. P.; PARRISH, C.; RICHTERS, V.; GROSHEN, S.G.; TSAO-WEI, D.; MARKLAND, F.S. Contortrostatin, a dimeric disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix*, inhibits breast cancer progression. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 61, p. 249-260, 2000.
- ZICHE, M.; PARENTI, A.; LEDDA, F.; DELL'ERA, P.; GRANGER, H. J.; MAGGI, C. A.; PRESTA, M. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. **J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 2625-2634, 1997.
- ZIGRINO, P.; KAMIGUTI, A. S.; EBLE, J.; DRESCHER, C.; NISCHT, R.; FOX, J. W.; MAUCH, C. The Reprolysin Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, functions as a fibrillar collagen agonista involved in fibroblast cell adhesion and signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 43, p. 40528-40535, 2002.

ZOLKIEWSKA, A. Disintegrin-like/cysteine-rich region of ADAM 12 is an active cell adhesion domain. **Exp. Cell Res.**, v. 252, n. 2, p. 423-431, 1999.