

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES**  
**Meire Coelho de Almeida**

**CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTI-  
ANGIOGÊNICA E ANTI-METASTÁTICA DA LEUCUROGINA,  
UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE PRODUZIDA A PARTIR  
DE cDNA OBTIDO DO VENENO DA SERPENTE *BOTHROPS*  
*LEUCURUS***

**Mogi das Cruzes, SP**

**2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES**

**Meire Coelho de Almeida**

**Caracterização das propriedades anti-angiogênica e anti-  
metastática da leucurogina, uma proteína recombinante  
produzida a partir de cDNA obtido do veneno da serpente  
*Bothrops leucurus***

Dissertação apresentada ao  
programa de Pós-graduação  
em Biotecnologia da  
Universidade de Mogi das  
Cruzes como parte dos  
requisitos para obtenção do  
título de Mestre em  
Biotecnologia.

**Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero**

**Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Débora Ayame Higuchi**

**MOGI DAS CRUZES, SP**

**2010**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Almeida, Meire Coelho de

Caracterização das propriedades anti-angiogênica e anti-metastática da leucurogina, uma proteína recombinante produzida a partir de cDNA obtido do veneno da serpente *Bothrops leucurus* / Meire Coelho de Almeida. – 2010. 83 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2010

Área de concentração: Biotecnologia aplicada a recursos naturais e agronegócios

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Jorge Luiz Pesqueiro

1. Angiogêneses                      2. Câncer    3. Proteínas recombinantes 4. Antagonista de integrina 5. Medicina

experimental I. Pesqueiro, Jorge Luiz CDD 619.93

**ATAS**

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES**

Às catorze horas e trinta minutos do dia vinte e sete de janeiro de dois mil e dez, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Caracterização das propriedades anti-angiogênica e anti-metastática da leucurogina, uma proteína recombinante produzida a partir de cDNA obtido do veneno da serpente *Bothrops leucurus*" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Meire Coelho de Almeida**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 48 (quarenta e oito), a saber: 24 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores Jorge Luiz Pesquero da Universidade Federal de Minas Gerais, Ivan Carlos dos Santos do Centro Universitário UNA e Ivarne Luis dos Santos Tersariol da Universidade de Mogi das Cruzes, sob a presidência do(a) primeiro(a), como orientador(a) da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADA por UNANIMIDADE  
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 27 de janeiro de 2010.

Comissão Examinadora


Julgamento

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero

APROVADA  
(aprovado(a)/reprovado(a))

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ivan Carlos dos Santos

APROVADA  
(aprovado(a)/reprovado(a))

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol

APROVADA  
(aprovado(a)/reprovado(a))

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família que com certeza torcem muito para meu sucesso. Jacy, Terezinha, Márcia, Mislene, Luiz e Rafael e Babi. Obrigada por tudo!

Aos meus amigos que com certeza estão muito felizes por essa conquista.

Ao profº Dr. Jorge Luiz Pesquero pela orientação e oportunidade de desenvolver essa pesquisa.

Ao prof. Dr. Luiz Rodolfo Travassos pela oportunidade de desenvolver parte dos meus experimentos em colaboração no departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de São Paulo – Unifesp.

À Dra Thaysa Paschoalin do departamento de Microbiologia e Imunologia da Unifesp pela colaboração nos ensaios biológicos.

Aos Professores Doutores Ivarne e Douglas pela colaboração e participação no exame de qualificação.

Aos alunos do departamento de Microbiologia e Imunologia da Unifesp, Fi, Felipe, Juliana e Luana pelas discussões científicas.

As amigas de laboratório Débora pela co-orientação, Fernanda Rezende e Haline pela amizade e incentivo.

Aos amigos, Lyvyam, Valter, Flávio, Pedro e todos da empresa Exa-M pela amizade, incentivo, colaboração e momentos de descontração nos almoços e cafezinhos durante toda minha estadia na Intec.

Aos funcionários da UMC, em especial Douglas do Biotério e a secretária Renata pelos favores e serviços prestados.

À agência financiadora de pesquisa, FINEP.

A todos que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

## RESUMO

Leucurogina (leuc) é uma proteína recombinante obtida do cDNA da glândula da serpente *B. leucurus* que apresenta atividade antagonista de integrina. Esta proteína é 98% homóloga ao domínio desintegrina da jararagina, uma SVMP que pertence à classe P-III, ou seja desintegrina-ECD. Pelo fato de ter sido clonada da serpente *B. leucurus* e por apresentar atividade anti-agregação plaquetária foi denominada apresenta leucurogina. Além de apresentar capacidade de inibição da agregação plaquetária, é também capaz de inibir adesão celular e crescimento tumoral em linhagens como Ehrlich e melanoma. Com objetivo de contribuir para o estudo da atividade biológica da leucurogina, resolvemos desenvolver este trabalho com o objetivo de caracterizar sua atividade anti-angiogênica e anti-metastática. Após a produção da leuc, a mesma foi purificada em cromatografia de troca iônica (coluna Q-sepharose). Em ensaios biológicos de angiogênese *in vitro* na presença de células endoteliais-HUVEC acrescidas de matrigel, 50 µg/mL de leuc inibiu fortemente a formação de estruturas pró-angiogênicas, necessárias para a formação de vasos sanguíneos. Essa redução foi de aproximadamente 66%. Para análise de angiogênese *in vivo* foi utilizada matriz esponja. Na dose 10 µg/animal leuc reduziu significativamente os níveis de hemoglobina na esponja nas duas vias de tratamentos. Na concentração de 10 µg/mL reduziu a proliferação celular de melanoma murino (B16F10) e células endoteliais HUVEC estimuladas com FGF em estudos *in vitro*. Apresentou também capacidade de reduzir (44%) a massa tumoral de tumores de Ehrlich em camundongos *Swiss* tratados com injeções diárias de 10 µg/animal da proteína por 7 dias. Em ensaios de metástase tumoral pulmonar 5 µg/animal de leucurogina a cada 48 horas inibiu fortemente o número de nódulos tumorais nos pulmões (indicadores de metástase) de camundongos C57. Esses resultados mostram que leucurogina possui ação de inibição da angiogênese e de metástase tumoral.

**Palavras chaves:** angiogênese, desintegrina-símile, proteína recombinante, antagonista de integrina, metástase.

## Abstract

Leucurogin (leuc) is a recombinant protein cloned from the venom gland of *B. leucurus* snake that is able to antagonize effects of integrin receptors. This protein is 98% homologous to the disintegrin-simile domain of jararagin, a metalloproteinase that belong to the class P-III of SVMPs. Leuc showed to be able to inhibit platelet aggregation, cellular adhesion and tumoral growth of Ehrlich and melanoma tumors. Leuc was produced using *P. pastoris* expression system and purified by chromatography on ionic exchange column (Q-sepharose). In *in vitro* assays with HUVEC, in the presence of matrigel, leucorogin at 50 µg/mL inhibited the formation of pro-angiogenic structures, necessary for the formation of blood vessels. This reduction was of approximately 66%. At 10 µg/mL, leucurogin reduced the cellular proliferation of murine melanoma (B16F10) and endothelial cells (HUVEC) stimulated with FGF. For *in vivo* studies of angiogenesis it was used the implanted sponge model. At dose 10 µg/animal leuc significantly reduced the levels of hemoglobin in the sponge. After treatment with leucurogin by 7 days it also presented capacity to reduce (44%) the tumoral mass of Ehrlich tumor implanted in Swiss mice. Leucurogin showed also to be able to inhibit metastasis. At the dose of 5 µg/animal/day it strongly inhibited the number of nodules in the lung of C57B16 mice. These results show that leucurogin is able to inhibit angiogenesis and tumoral metastasis.

**Keywords:** angiogenesis, disintegrin-like, recombinant protein, integrin antagonist, metastasis.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> Esquema da Vasculogênese e os tipos de angiogênese.....	<b>15</b>
<b>Figura 2</b> Esquema da Morfologia de um vaso.....	<b>16</b>
<b>Figura 3</b> Esquema do processo metastático do câncer.....	<b>20</b>
<b>Figura 4</b> Esquema da progressão de uma massa tumoral.....	<b>21</b>
<b>Figura 5</b> Esquema Cascata de sinalização celular por interação de integrinas e fatores de crescimento.....	<b>26</b>
<b>Figura 6</b> Esquema da classificação das SVMs.....	<b>29</b>
<b>Figura 7</b> Perfil de expressão da leucurogina pela <i>P. pastoris</i> após indução com metanol. Eletroforese em SDS-PAGE 12,5% corado com prata.....	<b>44</b>
<b>Figura 8</b> Perfil cromatográfico da leucurogina obtido em coluna Q-sepharose (0,5 x 2 m) <b>(A)</b> . Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, mostrando o perfil de eletroforético das amostras de leucurogina após cromatografia por troca iônica <b>(B)</b> .....	<b>45</b>
<b>Figura 9</b> Análise da citotoxicidade da leucurogina sobre as células de melanoma murino B16F10 <b>(A)</b> e células endoteliais umbilicais de humano - HUVEC <b>(B)</b> .....	<b>46</b>
<b>Figura 10</b> Angiogênese de HUVEC com adição de matrigel.....	<b>47</b>
<b>Figura 11</b> Imagens das estruturas pró-angiogênicas capturadas após de 18 h de cultivo de HUVEC.....	<b>48</b>
<b>Figura 12</b> Análise da proliferação celular para a linhagem tumoral B16F10 <b>(A)</b> e para as células endoteliais HUVEC <b>(B)</b> .....	<b>49</b>
<b>Figura 13</b> Massa tumoral de tumor de Ehrlich crescida no subcutâneo de camundongos <i>Swiss</i> machos.....	<b>50</b>
<b>Figura 14</b> Esponja retiradas do dorso de camundongos <i>Swiss</i> machos após 15 dias de tratamento.....	<b>51</b>
<b>Figura 15</b> Níveis de hemoglobina em matriz de esponja implantada no dorso de camundongos <i>Swiss</i> machos de 2 a 3 meses de idade. <b>(A)</b> via de tratamento intraperitoneal. <b>(B)</b> aplicação feita diretamente na esponja.	<b>51</b>
<b>Figura 16</b> Pulmões de camundongos C57B16 machos submetidos à inoculação de células de melanoma murino (B16F10).....	<b>53</b>

**Figura 17** Número de nódulos tumorais indicadores de metástase pulmonar de melanoma murino.....

# SUMÁRIO

<b>I INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1. Angiogênese .....	<b>15</b>
1.1 Principais fatores de crescimento envolvidos na angiogênese.....	<b>17</b>
1.2 Angiogênese tumoral.....	<b>19</b>
1.3 Matriz extracelular e degradação da membrana basal.....	<b>21</b>
1.4 Adesão celular.....	<b>23</b>
1.5 Integrinas.....	<b>23</b>
1.6 Papel das integrinas no desenvolvimento tumoral.....	<b>25</b>
1.7 Veneno de serpentes.....	<b>28</b>
1.8 Metaloproteínas do veneno da serpente.....	<b>28</b>
1.9 Desintegrinas clássicas e similares.....	<b>29</b>
1.10 Leucurogina .....	<b>31</b>
<b>II OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
2. Geral.....	<b>34</b>
2.1 Específicos.....	<b>34</b>
<b>III MÉTODO</b> .....	<b>35</b>
1. Equipamentos utilizados.....	<b>35</b>
2. Animais .....	<b>35</b>
3. Linhagens celulares.....	<b>36</b>
4. Colunas cromatográficas e placas para cultivo celular.....	<b>36</b>
5. Expressão da leucurogina.....	<b>36</b>
6. Clarificação da proteína.....	<b>37</b>
7. Cromatografia de troca iônica.....	<b>37</b>
8. Dosagem de proteínas.....	<b>37</b>
9. Eletroforese analítica em gel de poliacrilamida.....	<b>38</b>
10. Coloração por prata.....	<b>38</b>
11. Cultivo celular.....	<b>39</b>
12. Estudo da viabilidade celular .....	<b>39</b>
13. Estudo da angiogênese <i>in vitro</i> .....	<b>39</b>
14. Proliferação celular.....	<b>40</b>
15. Ensaio <i>in vivo</i> da inibição do crescimento tumoral.....	<b>40</b>
16. Angiogênese inflamatória com uso de matriz de esponja.....	<b>41</b>

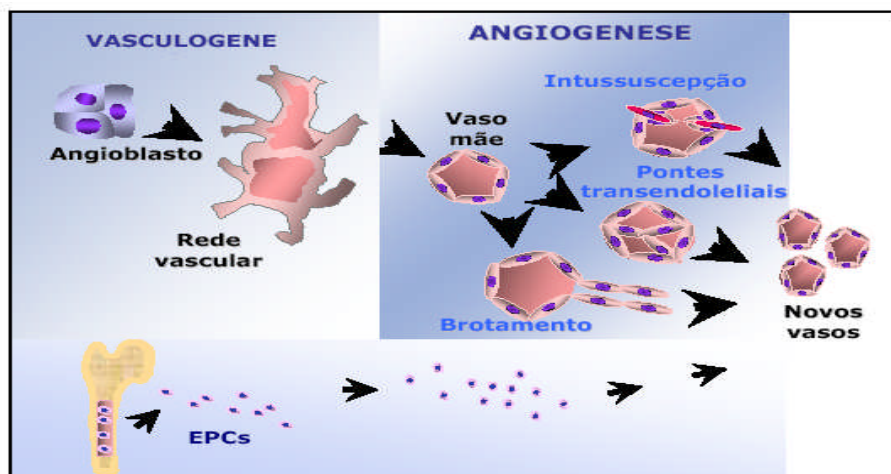
17. Dosagem de hemoglobina.....	42
18. Análise estatística.....	43
<b>IV RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
1 Expressão da leucurogina.....	44
2 Clarificação da leucurogina .....	44
3 Estudo <i>in vitro</i> .....	45
3.1 Análise da citotoxicidade .....	45
3.2 Estudos de angiogênese .....	46
3.3 Proliferação celular.....	48
4. Estudos <i>in vivo</i> .....	49
4.1 Inibição do crescimento tumoral.....	49
4.2 Dosagem de hemoglobina das matrizes de esponjas.....	50
4.3 Metástase pulmonar.....	52
<b>V DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>VI CONCLUSÕES .....</b>	<b>63</b>
<b>VII REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>80</b>

# I. Introdução

## 1. Angiogênese

O termo angiogênese foi utilizado pela primeira vez em 1935 por Hertig para descrever o processo de vascularização na placenta. Entretanto, o estudo sistemático da angiogênese teve início em 1963, por Judah Folkman, e progressivamente foram desenvolvidos vários modelos *in vitro* e *in vivo* para o estudo de seus mecanismos moleculares, modulação e sua importância nos processos fisiológicos e patológicos (FOLKMAN e BREM, 1992).

Angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (PASCHOALIN e cols, 2007). De acordo com Carlos e Harlan (1994); Folkman (1995), este mecanismo apresenta papel chave no desenvolvimento embrionário, o qual é iniciado pela *vasculogênese*, onde uma rede vascular primitiva é formada através da agregação de angioblastos (células progenitoras) durante a embriogênese (RISAU e FLAME, 1995), como mostra a figura 1.



**Figura 1.** Vasculogênese e os tipos de angiogênese: brotamento, o mais frequente; intussuscepção e pontes trans-endoteliais e recrutamento de células progenitoras endoteliais (EPCs) da medula óssea (CARMELIET, 1988).

A angiogênese também está envolvida nos eventos de cicatrização, inflamação e reparação dos tecidos, por meio de mitógenos, citocinas e outras moléculas por eles liberados, transportados e/ou produzidos. Basicamente, vasos sanguíneos são constituídos de: células endoteliais, que estão em contato direto com o sangue; pericitos, localizados abaixo do endotélio; células musculares lisas;

fibroblastos; membrana basal e matriz extracelular (MEC), que podem assumir composição e funções diferentes dependendo da localização no organismo e de constituintes celulares (RAJOTTE e cols, 1998) (Figura 2).



**Figura 2.** Morfologia de um vaso.

As células endoteliais migram, proliferam e conectam-se através de junções firmes entre elas formando o tubo que conterá o sangue que perfunde os tecidos. Células de suporte são recrutadas para revestir este tubo endotelial provendo sustentação e funções modulatórias, como os pericitos para pequenos capilares, células musculares lisas para grandes vasos e células miocárdicas para o coração (HANAHAN, 1997).

As etapas da angiogênese envolvem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular em resposta ao óxido nítrico e fator de crescimento de células endoteliais (VEGF), degradação da membrana basal por metaloproteinasas (MMPs), perda das junções entre as células endoteliais pela ação do ativador do plasminogênio, migração e proliferação das células endoteliais, formação de cordões endoteliais, formação de membrana basal, maturação e remodelamento, recrutamento de células periendoteliais (JAIN, 2003).

As células endoteliais do sistema vascular no adulto normal são quiescentes, sendo sua reciclagem um processo muito lento. A exceção ocorre em processos extremamente ordenados como no ciclo reprodutivo feminino (ovulação, implantação e gestação ou menstruação). Apenas nestes casos ou em resposta a um estímulo apropriado, como na cicatrização de feridas ou crescimento tumoral, este sistema quiescente é ativado e produz novos capilares (HANAHAN e FOLKMAN, 1996).

A angiogênese está sujeita a um complexo sistema de controle com fatores angiogênicos e anti-angiogênicos (angiostáticos). No indivíduo adulto, o crescimento vascular está sob rigoroso controle, havendo uma predominância dos fatores angiostáticos sobre os angiogênicos. A neovascularização só ocorre quando esta relação for inversa. Como exemplo de fatores angiostáticos existem os pericitos, vários componentes da matriz extracelular como endostatina (O'REILLY e cols, 1997) e tunstatina (MAESHIMA e cols, 2000), fragmentos de colágenos tipos XVIII (matriz extracelular) e IV (membrana basal) e trombospondina. Como exemplo de fatores pró-angiogênicos existem a injúria, hipóxia, citocinas (VEGF, TNF- $\alpha$ ), quimiocinas, angiogenina e células inflamatórias (D'AMORE e THOMPSON, 1987; BERNARDINI e cols, 2003).

### **1.1 Principais fatores de crescimento envolvidos na angiogênese**

As citocinas são polipeptídeos mediadores locais, envolvidos em vários processos biológicos importantes tais como a imunidade e inflamação. As citocinas participam da imunidade inata, apresentação de antígeno, diferenciação de células da medula óssea, ativação e recrutamento celular, expressão de moléculas de adesão, regulação do crescimento e diferenciação celular. Influenciam a implantação do embrião e o desenvolvimento fetal, e podem ser importantes em doenças não imunológicas (FELDMANN e cols, 1996; MÜLLER, 2002; BORISH e STEINKE, 2003).

Para Stefanini e cols (2008) e Chavakis e Dimmeler (2002), o VEGF é uma potente citocina envolvida na angiogênese por atuar estimulando a mitose de células endoteliais, sendo considerado um regulador chave das angiogêneses fisiológica e patológica. De acordo com Bronchud e cols (2008), o VEGF é considerado o primeiro fator pró-angiogênico a ser produzido durante a embriogênese. Ele também aumenta a permeabilidade microvascular que pode preceder ou acompanhar a angiogênese, a diferenciação de células, a proliferação, a migração e a sobrevivência (HOEBEN e cols, 2004). Pesquisas realizadas utilizando camundongos mostram que a deficiência de VEGF diminui a mitose de células endoteliais comprometendo o sistema vascular, levando a morte durante o desenvolvimento embrionário (CHAVAKIS e DIMMELER, 2002).

De acordo com Yan e cols (2007), o VEGF inicia seu efeito angiogênico ligando-se a duas tirosinaquinases homólogas, VEGF-receptor tirosinaquinase 1 (VEGFR1) e VEGF-receptor tirosinaquinase 2 (VEGFR2). A transcrição do mRNA do VEGF pode ser induzida pela secreção de diferentes fatores de crescimento e citocinas, incluindo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epitelial EGF, fator de necroses tumoral (TNF- $\alpha$  e  $\beta$ ) e interleucina (IL-1 $\beta$ ) (VEIKKOLA e ALITALO, 1999; AKAGI e cols, 1999, ENHOLM e cols, 1997). Os níveis de VEGF liberados são regulados, principalmente, pela tensão de oxigênio no tecido. Condições geradoras de hipoxia induzem rapidamente aumento da produção e secreção de VEGF local (FERRARA e cols, 1998).

Em humano, a família do VEGF é composta por cinco membros: VEGF A (também referido como VEGF) VEGF B, C, D e fator de crescimento placentário (PlGF) (STEFANINI e cols, 2008). O VEGF é expresso principalmente por células endoteliais (SHIRAKAWA e cols, 2002; BRONCHUD e cols, 2008), entretanto, está também expresso em diferentes tecidos tais como: cérebro, rim, fígado e baço, além de alguns tipos celulares, como macrófago em resposta a hipóxia e hipoglicemia (VEIKKOLA e ALITALO, 1999; HOEBEN e cols, 2004). Ele pode ser estocado na matriz extracelular como um ligante de heparina sulfato proteoglicano. Quando a angiogênese é requerida o VEGF pode ser liberado da MEC, ou novamente produzido devido sua freqüente expressão (BRONCHUD e cols, 2008; SHIRAKAWA e cols, 2002).

Além do VEGF, células endoteliais podem expressar fatores de crescimento de fibroblasto (FGF), uma família de proteínas que participam de processos chave nos mais variados tecidos, e apresentam funções parácrina, autócrina e justácrina, regulando mitose, diferenciação celular, morfogênese e cicatrização. Além disso, os FGF estão envolvidos no desenvolvimento normal, no processo de angiogênese e em atividades neutróficas. Estão envolvidos também na hematopoiese por serem potentes reguladores de crescimento e diferenciação para uma variedade de células mesodermiais, ectodermiais e de origem endodermal. Entretanto, a relação estrutura-função dos FGFs ainda é pouco entendida. O principal membro desta família, o FGF-2, apresenta quatro isoformas moleculares incluindo a forma de 18 kDa, citoplasmática que quando é secretada se liga aos receptores específicos (FGFRs) e dispara uma complexa cascata de sinalização celular. As outras isoformas, de alto



peso molecular (21, 22 e 22,5 kDa) apresentam localização nuclear e provavelmente atuem de maneira justácrina (HOEBEN e cols, 2004).

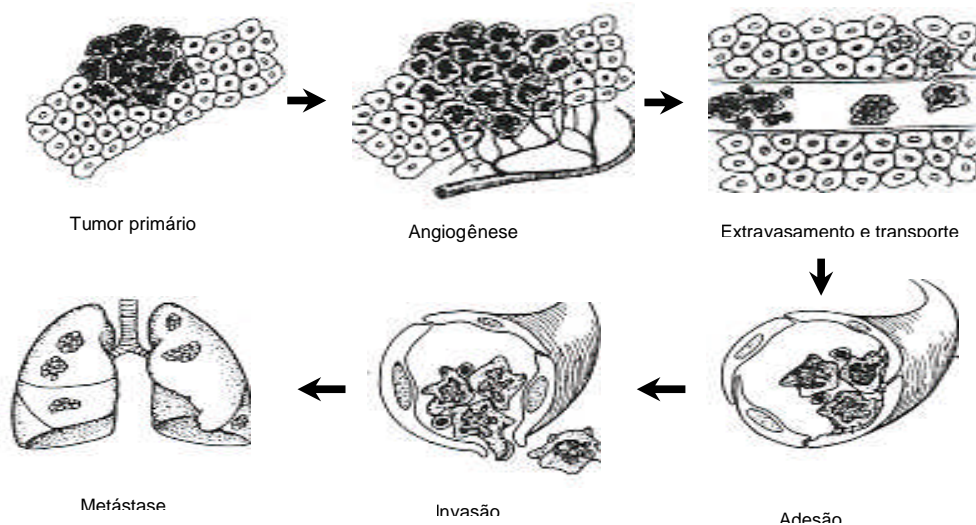
Todos os membros dessa superfamília possuem dois resíduos cisteína conservados e apresentam homologias de 30 a 50% nas seqüências de aminoácidos. Estão sendo intensamente estudados por estarem envolvidos em condições patológicas tais como tumorigênese e em processo de metástase (ARTONI e cols, 2007). Para Nikitovic e cols (2007), os membros da família FGF funcionam com alta afinidade por meio de quatro distintos receptores de superfície celular: FGFR 1, FGFR 2, FGFR 3 e FGFR 4. A ligação de FGF no domínio ligante extracelular de FGFR induz a dimerização, ativação e autofosforilação de múltiplos resíduos tirosina de domínio citoplasmático levando a estimulação de vias de sinalização intracelular que controlam a proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência de diferentes tipos celulares, incluindo células endoteliais que dão origem aos vasos sanguíneos para vascularizar tecidos normais e tumorais.

## 1.2 Angiogênese tumoral

Willis (1952) definiu as neoplasias como sendo uma “massa anormal, cujo crescimento não é coordenado como os tecidos normais e persiste na mesma maneira excessiva depois da interrupção dos estímulos que originam a mudança”. A persistência do crescimento tumoral, com ausência de estímulo é resultado de alterações genéticas hereditárias na célula tumoral progenitora. Estas alterações levam a proliferação excessiva e desregulada da célula tornando-a autônoma (KUMAR e cols, 2005). Do ponto de vista clínico, evolutivo e de comportamento, as neoplasias são divididas em duas categorias: *benignas* e *malignas*. As neoplasias benignas, em geral, possuem baixo índice mitótico, o crescimento tende a ser lento e expansivo. O tumor é bem delimitado e geralmente não recidivam após ressecção cirúrgica. As neoplasias malignas apresentam algumas características tais como alterações na expressão gênica com tendências à síntese de isoformas das enzimas predominantes na fase embrionária e suas células captam aminoácidos com maior velocidade do que as células normais. As células são mais resistentes à hipóxia, são mais indiferenciadas, tem menor adesão entre si, tem mobilidade considerável, geralmente dão metástase (BRASILEIRO-FILHO e GUIMARÃES, 2000).

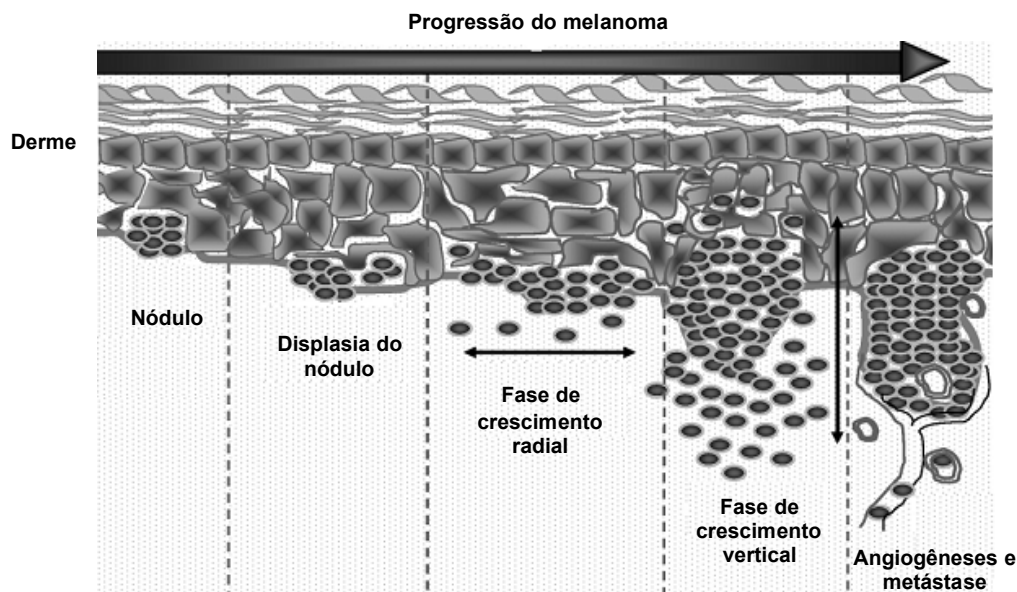
Diagnosticado o câncer, é importante saber se a doença está localizada ou se está distribuída pelo organismo. Para Bronchud e cols (2008), em aproximadamente 30% dos novos pacientes diagnosticados com tumores sólidos, exclusivamente cânceres de pele, têm sido detectados metástase. Adicionalmente, 20% dos pacientes têm metástase oculta durante o período de diagnóstico. A metástase tumoral é um processo com múltiplas etapas (DERYUGINA e QUIGLEY, 2006), como mostrado na figura 3. Segundo Radinsky e Fidler (2003), o sucesso deste processo depende da interação das células malignas com três distintos microambientes, a saber:

- a) Órgão primário - responsável pelo aparecimento e suporte do tumor primário;
- b) Circulação - corrente sanguínea ou sistema linfático responsável pelo transporte das células tumorais;
- c) Órgão alvo - onde células tumorais irão se aderir e se desenvolver, originando tumores secundários.



**Figura 3.** O processo metastático do câncer (HIGUCHI, 2009).

O crescimento de tumores sólidos, como mostrado nas figuras 3 e 4, assim como sua habilidade de produzir metástases é dependente do processo angiogênico (FOLKMAN e cols, 1989).



**Figura 4.** Progressão de uma massa tumoral (MAHABELESWAR e BYZOVA, 2007).

Folkman (1972), propôs que tumores primários produzem moléculas responsáveis por ambos estímulos angiogênicos e inibitórios, podendo direcionar a evolução dependendo dos vasos sanguíneos e seus mediadores. Descobertas recentes mostram que o tumor inicia o processo angiogênico quando atinge tamanho aproximado de 1 a 2 mm<sup>3</sup> (BRONCHUD e cols, 2008). É neste estágio que a angiogênese passa a ter papel fundamental, promovendo nutrientes e oxigênio para células tumorais (PASCHOALIN e cols, 2007). Há um delicado equilíbrio entre indução e inibição da neovascularização e quando há progressão da malignidade, células tumorais balanceiam para o fenótipo angiogênico (BRONCHUD e cols, 2008).

A hipóxia também contribui para a angiogênese. Pode ser causada por uma alteração em qualquer mecanismo de transporte de oxigênio, desde uma obstrução física do fluxo sanguíneo em qualquer nível da circulação corpórea, anemia e crescimento tumoral.

### 1.3 Matriz extracelular e degradação da membrana basal

A MEC é composta por proteínas globulares, carboidratos complexos, proteínas fibrilares, elastina, laminina, fibronectina e colágeno. Ela ocupa os espaços entre as células mantendo-as unidas aos tecidos. É mais abundante nos tecidos conjuntivos. Além das proteínas e dos polissacarídeos de estrutura fibrosa, a

matriz extracelular contém proteínas de adesão que ligam componentes da matriz entre si e as células aderentes. A principal proteína da matriz extracelular é o colágeno, que é a mais abundante nos tecidos animais. Os colágenos formam uma grande família de proteínas contendo pelo menos 19 membros diferentes. Estes são caracterizados pela formação de hélices tríplices nas quais três cadeias polipeptídicas se encontram associadas de forma firme e compacta.

O colágeno do tipo I é um dos colágenos formados de fibrilas que compõem a estrutura básica dos componentes do tecido conjuntivo. A lamina basal é formada a partir de diferentes tipos de colágeno que formam uma estrutura em rede. Esse complexo pode ser hidrolisado por enzimas proteolíticas presentes na matriz (LIEKENS e cols, 2001).

As células endoteliais recrutadas durante processo angiogênico possuem a capacidade de produzir enzimas proteolíticas que degradam a membrana basal e a matriz extracelular, e conseqüentemente invadem o estroma adjacente. A degradação de tecidos conjuntivos de componentes da MEC é um fator importante também para a invasão de células tumorais e metástase. A partir da ação de enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases, células neoplásicas conseguem atravessar difíceis barreiras, como a membrana basal chegando à circulação e à promoção da metástase (TRYGGVASON, 1993; YOON e cols, 2003).

As metaloproteinases pertencem a uma família multigênica de endopeptidases contendo zinco (BARRET e cols, 2004; VISSE e cols, 2003). Vinte e três diferentes MMPs têm sido identificadas em humanos e vinte quatro em camundongos, que podem ser produzidas também por células endoteliais. As MMPs são capazes de degradar proteínas da MEC de mamíferos. Diversas MMPs, em particular a MMP2, MMP-9 e MT1- MMP têm sido identificadas com papel muito importante na angiogênese. Células endoteliais em condições fisiológicas normais são quiescentes, produzem pouco ou nenhuma atividade de MMPs, mas essas proteinases são fortemente induzidas e subseqüentemente ativadas em capilares em crescimento durante o processo de cicatrização, inflamação e crescimento tumoral (HINSBERGH e KOOLWIJK, 2008). Após ativadas, as MMPs são controladas por um grupo de inibidores endógenos conhecidos como TIMPs (Tissue Inhibitors of MetalloProteinases) e por RECK (Reversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs) (BARRET e cols, 2004; HANDESLEY e EDWARDS, 2005).

## 1.4 Adesão celular

De acordo com Alberts (2004), as células em organismos pluricelulares estão organizadas em tecidos, que por sua vez formam os órgãos. Estas estruturas cooperativas são bastante complexas e a organização das células depende do contato com um complexo de moléculas extracelulares. Toda esta estrutura organizada de matriz, células e tecidos é mantida por moléculas de adesão que se encontram tanto na estrutura da matriz como na membrana celular. Além de manter este contato, as moléculas de adesão podem fechar espaços entre as células, como ocorre no tecido epitelial, e podem transmitir mensagens entre elas mediante sinais químicos ou elétricos. A adesão célula-célula é um processo seletivo, de modo que células aderem-se somente em tipos específicos de célula. Entre as mais importantes moléculas de adesão da membrana celular estão as selectinas, superfamília das imunoglobulinas, as caderinas, as metaloproteinases contendo o domínio desintegrina (ADAMs) e as integrinas (HINSBERGH e KOOLWIJK, 2008; COOPER, 2001).

## 1.5 Integrinas

Integrinas são glicoproteínas transmembranais heterodiméricas, compostas de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  associadas por ligação não covalente. A combinação das cadeias  $\alpha$  (18) e  $\beta$  (8) gera diversas integrinas de diferentes especificidades. A especificidade e a afinidade da ligação com os diferentes componentes da matriz extracelular serão definidas segundo o tipo de integrina presente, o número de cópias em cada célula, e também o tipo da célula em que a molécula se apresenta, criando uma grande versatilidade dessa família de proteínas na fisiologia dos tecidos (HYNES, 1992).

Estruturalmente, cada subunidade da integrina está formada por um domínio extracelular volumoso, uma região transmembrânica e uma cauda citoplasmática. A subunidade  $\alpha$  corresponde ao produto de um único gene que sofre proteólise resultando em uma cadeia pesada e uma cadeia leve, ligadas por uma ponte dissulfeto (PHILIPS e cols, 1988). A subunidade  $\beta$  apresenta um enovelamento intrincado de pontes dissulfeto (CALVETE e cols, 1994) bastante conservado entre as 8 subunidades (HYNES, 1992). As duas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  se juntam durante a biosíntese formando o complexo, necessário para a expressão na superfície da célula (DUPERRAY e cols, 1989). As integrinas têm sítios de ligação para cátions

bivalentes, e estes cátions são necessários para a ligação das integrinas com seus agonistas (PLOW e cols, 1992). Na cauda citoplasmática, as duas subunidades formam um complexo, um segundo domínio de ligação, que reconhece sinais intracelulares e proteínas do citoesqueleto.

Durante o desenvolvimento embrionário, as integrinas são onipresentes, regulando os movimentos morfogênicos e a migração celular e são especialmente expressas durante a gastrulação, neurulação e histogênese (ALBELDA e BUCK, 1990). Adicionalmente, as integrinas participam de processos fisiológicos como inflamação, cicatrização e agregação plaquetária (HEINO, 1993; RUDOLPH e CHERESH, 1990). A transdução de sinal originado pelas integrinas é bidirecional, isto é, ocorre de dentro para fora e de fora para dentro da célula. Para que ocorra a adesão célula-célula e/ou célula-matriz extracelular, as integrinas têm que ser ativadas. Esta ativação ocorre mediante estímulo local de mediadores solúveis tais como hormônios, citocinas e fatores de crescimento ou de interfaces sólidas como a matriz extracelular ou outras células. Igualmente importante é que as integrinas sejam inativadas para evitar a adesão celular e ligação a matriz em ocasiões e locais inadequados. A adesão inapropriada pode culminar em trombose ou processos inflamatórios não desejados. É importante que as integrinas tenham um eficiente mecanismo de ativação, uma vez que elas participam de processos rápidos como embriogênese e histogênese (MIZEJEWSKI, 1999).

A maior parte das células precisa aderir-se na matriz extracelular para crescer, funcionar e sobreviver apropriadamente. Durante a formação dos tecidos, a ligação célula-célula e célula matriz são mediadas por integrinas. Células normais podem sofrer apoptose quando desprovidas da matriz extracelular (GUI e cols, 1995).

Em cultura celular, a ligação ocorre em estruturas especializadas da membrana denominadas sítios de adesão focal constituído de agrupamentos de integrinas firmemente ligados à matriz extracelular. Sítios de adesão focal menos consistentes estão presentes no tecido epitelial permitindo maior flexibilidade e movimento celular. Estes agrupamentos de integrinas servem como sítios de ligação para fibras intracelulares de actina na superfície citoplasmática da membrana celular, influenciando assim a morfologia celular. Assim mesmo, neste centro de adesão focal tem início uma cascata de sinais que se cruzam com vias de fatores de crescimento, citocinas e quinases (LIU e cols, 1997), incluindo a quinase de adesão

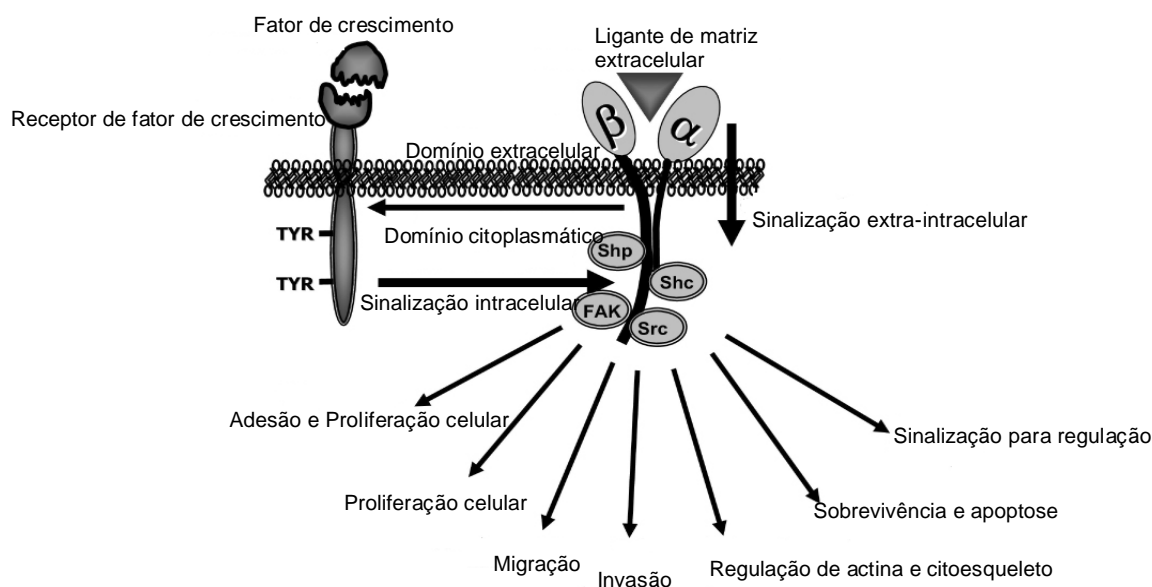
focal (FAK). Esta cascata de interação também pode estar ligada a proteínas-G e tirosinaquinases. Também tem sido relatado que a forma da célula esta diretamente ligada com seu crescimento e taxa de sobrevivência. Além disso, muitos estudos estão sendo direcionados para correlacionar a atividade das integrinas com o crescimento tumoral (JULIANO, 1993; CHEN e cols 1997).

## 1.6 Papel das integrinas no desenvolvimento tumoral

A transformação maligna é caracterizada pela perturbação da organização do citoesqueleto, diminuição da adesão e alteração das respostas dependentes de adesão. Estudos da expressão de integrinas em células transformadas sugerem que várias subunidades de integrinas participam tanto positiva como negativamente do fenótipo da célula transformada (RUOSLAHTI, 1992). Mudanças na expressão de integrinas receptoras de fibronectina têm sido observadas em alguns tipos de fibroblastos. Além disso, alterações nos padrões de expressão de integrinas têm sido observadas em inúmeras células malignas (PLANTEFABER e HYNES, 1989). Em geral, o fenótipo de uma célula transformada pode conter diversas alterações nos seus receptores. Por exemplo, altos níveis da integrina  $\alpha_5\beta_1$  parecem estar correlacionados com baixas taxas de transformação em certos tumores. No entanto, um aumento da expressão da integrina  $\alpha\nu\beta_3$  está diretamente relacionada com aumento da malignidade em melanomas (CHAN e cols, 1991). Como regra geral se pode mencionar a falta de organização espacial da expressão de integrinas em tumores epiteliais. Em carcinomas, o arranjo das integrinas é bastante desordenado com distribuição difusa e menos abundante. Estes desarranjos podem afetar a afinidade da ligação e estão correlacionados com a desorganização concomitante da estrutura da membrana basal. Níveis reduzidos de expressão das subunidades  $\alpha_5$ ,  $\alpha_3$  e  $\alpha_2$  têm sido reportados em carcinomas, enquanto um aumento dos níveis da integrina  $\alpha_6\beta_4$  aparece em tumores de cabeça, pescoço e pele (MIZEJEWSKI, 1999). Após transformação de linhagens celulares de roedores com o vírus de sarcoma, a integrina  $\alpha_5\beta_1$  desaparece da superfície celular enquanto os níveis de  $\alpha_3\beta_1$  permanecem constantes (HEINO, 1993). Outras mudanças relacionadas com a transformação envolvem aumento da fosforilação, diminuição da afinidade por ligantes, aumento da glicosilação de oligossacarídeos N-ligados nas integrinas. Como mencionado acima, a presença da integrina  $\alpha_5\beta_1$  está associada com um

fenótipo celular normal e a super expressão desta integrina pode normalizar um fenótipo transformado (CHEN e cols, 1991). Em comparação, células de osteosarcoma humano transformadas com vírus requerem o receptor  $\alpha_2\beta_1$  de colágeno. A reorganização da matriz (colágeno) parece ser uma das razões da importância da expressão desta integrina para células transformadas formarem tumores (MIZEJEWSKI, 1999).

Muitos estudos vem sendo realizados para entender a participação das integrinas no desenvolvimento tumoral (GULLBERG, 2003). Fatores de crescimento que ativam receptores tirosinaquinase também podem modular diversas funções mediadas pelas integrinas em células normais e tumorais (figura 5) (YAN e cols, 2007; BRONCHUD, 2008).



**Figura 5.** Cascata de sinalização celular por interação de integrinas e fatores de crescimento ligantes de receptores tirosinaquinase (MAHABELESWAR e BYZOVA, 2007).

Para Miyamoto e cols (1996), as interações de ligantes com integrinas podem estimular uma variedade de eventos de sinalização, incluindo fosforilação, influxo de cálcio, ativação de dois tipos de proteína MAP, sinalização extracelular e alteração na expressão gênica. Integrinas podem colaborar ou funcionar sinergicamente com fatores de crescimento numa variedade de processos biológicos incluindo: crescimento celular, diferenciação de fibroblastos, células epiteliais, mioblastos, condrócitos e ativação de trocador de sódio de hidrogênio da via dependente de proteína quinase C. Fatores de crescimento e integrinas estimulam locomoção celular por organizarem mudanças no citoesqueleto. Para a



angiogênese, quando exposta a fatores de crescimento células endoteliais quiescentes expressam novas integrinas que modulam migração endotelial. Todos os mecanismos celulares acima descritos são ativados em processos fisiológicos normais. No entanto, ocorre um aumento desordenado desses eventos de sinalização em processos patológicos como o câncer (RUBIN'S e STRAYER, 2008).

A interação entre integrinas e fatores de crescimento é um processo complexo que regula eventos importantes que vão desde o desenvolvimento de vasos sanguíneos durante a embriogênese até o crescimento tumoral, angiogênese seguida de metástase. A Tabela 1 apresenta as interações entre integrinas e fatores de crescimento incluindo as respectivas respostas em células normais e tumorais (ELICIERI, 2001).

**Tabela 1:** Interações entre integrinas e fatores de crescimento

Fator de crescimento	Integrina	Resposta celular
PDGF	$\alpha_v\beta_3$	proliferação, migração
bFGF	$\alpha_v\beta_3$ $\alpha_5\beta_1$	angiogênese, migração
VEGF	$\alpha_v\beta_5$	angiogênese
VEGF	$\alpha_v\beta_5$ $\alpha_v\beta_3$ e $\beta_1$	adesão, migração
VEGF	$\alpha_2\beta_1$ $\alpha_1\beta_1$ $\alpha_v\beta_3$	angiogênese, migração
EGF	$\alpha_v\beta_5$	angiogênese, metástase
EGF	$\alpha_v\beta_3$ e $\beta_1$	proliferação
IGF/Insulin	$\alpha_v\beta_5$	migração, metástase

Integrinas presentes em células endoteliais atuam como receptores de colágeno, laminina, fibronectina e trombospondina. As integrinas  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_2\beta_1$  e  $\alpha_1\beta_1$  são conhecidas por estarem envolvidas na angiogênese (CLEMETSON, 1998). Antagonistas destas integrinas como anticorpos monoclonais, peptídeos inibidores e oligonucleotídeos antisense  $\beta_3$  e  $\beta_5$  causam a regressão de tumores e inibição da angiogênese (GLADSON, 1996). Anticorpos anti  $\alpha_v$ , peptídeos sintéticos com a sequência RGD (Arg-Gly-Asp) podem competir e bloquear diversas ligações de integrinas e seus ligantes. Muitas proteínas são encontradas na natureza e descritas como antagonistas naturais de integrinas, como por exemplo, as metaloproteinase do veneno da serpente (SVMPs). Essas metaloproteinases contêm domínios que são os principais fatores na preferência para algumas integrinas. Por serem os

maiores receptores de colágeno é possível que antagonistas de integrinas, bem como as SVMPs tenham resultados significativos para o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas inibidoras de angiogênese (CLARK e BRUGGE, 1995; SANTORO e ZUTTER, 1995; KERN e cols, 1994; CLEMETSON, 1998

## 1.7 Veneno de serpentes

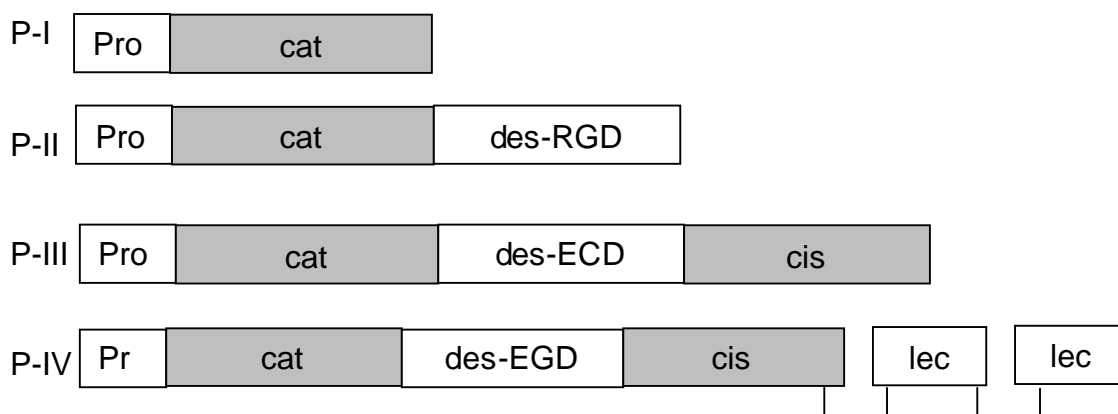
Picadas de serpentes podem ser mortais, mas o veneno também contém componentes de valor biotecnológico e medicinal. A caracterização das proteínas do veneno tem trazido benefícios para a pesquisa básica, diagnóstico clínico e desenvolvimento de novas drogas de uso terapêutico. Além disso, é também importante para um entendimento da evolução e seus efeitos biológicos (CALVETE e cols, 2007).

As serpentes do gênero *Bothrops* pertencem à família *Viperidae*, possuem hábitos terrestres ou arborícolas (THALES, 2002). São as mais comuns e responsáveis por mais de 85% dos acidentes peçonhentos. Há mais de 20 espécies de serpentes pertencentes a esse gênero, que habitam do sul da Bahia até o Rio Grande do Sul, leste de Mato Grosso e todo o Nordeste. Por terem ação proteolítica os venenos de serpentes levam à necrose dos tecidos ao redor da picada. Os principais componentes encontrados no veneno desse gênero são proteínas, que respondem por cerca de 90% do peso seco (HATI e cols, 1999; GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000). Dentre essas proteínas podemos encontrar: hialuronidase que possui poder redutor da viscosidade do tecido conjuntivo aumentando a permeabilidade e acelerando a expansão de outros constituintes do veneno; L-aminoácido oxidase que ataca uma grande variedade de substratos causando destruição tecidual; polipeptídeos básicos que são potentes bloqueadores neuromusculares; fosfolipases que atacam membranas celulares; fosfatases que atacam compostos de fosfato de alta energia - ATP e enzimas proteolíticas denominadas metaloproteinases do veneno da serpente (SVMPs) que digerem proteínas do tecido e peptídeo (THALES, 2002).

## 1.8 Metaloproteinases do veneno da serpente

As SVMPs podem ser classificadas, de acordo com o número de domínio, em três classes principais. A classe P-I que contém apenas o domínio catalítico; a

classe P-II que contém o domínio catalítico seguido do domínio desintegrina na posição C-terminal; e a classe P-III que apresenta o domínio catalítico seguido de um domínio desintegrina-ECD e um domínio rico-em-cisteína. Estas classes são precedidas de um peptídeo sinal e um pro-domínio (BJARNASON e FOX, 1995; FOX e SERRANO, 2008). Estes autores sugerem a existência de uma quarta classe, P-IV, onde o domínio desintegrina-ECD estaria unido com dois domínios lectina através de duas pontes dissulfeto (Figura 6).



**Figura 6.** Classificação dos domínios das SVMPs após serem divididas em grupos. Grupo P-I: Pro: protease dependente de zinco<sup>2+</sup>; cat: domínio catalítico. Grupo P II: des-RGD: Domínio desintegrina-RGD. Grupo P III: des-ECD: Domínio desintegrina-ECD, cis: Domínio cisteína. Grupo IV: lec: Domínio lectina. (BJARNASON e FOX 1995; FOX e SERRANO, 2008).

As SVMPs estão evolutivamente relacionadas com as ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) e as MMPs (Matrix Metalloproteinases). Estas proteínas estão incluídas na família M12 de metaloproteinases dependentes de zinco baseadas na estrutura do sítio catalítico e no motivo de ligação ao zinco. O peptídeo sinal e o pró-domínio também são conservados na família. Entretanto, diferente das MMPs que apresentam o domínio hemopexina na extremidade C-terminal do domínio catalítico, as ADAMs e as SVMPs apresentam o domínio desintegrina e rico-em-cisteína. As SVMPs são solúveis enquanto as ADAMs apresentam domínios transmembrânicos e citoplasmáticos, responsáveis por sua localização na superfície celular (BJARNASON e FOX, 1995; FOX e SERRANO, 2008; RIBEIRO, 2005).

## 1.9 Desintegrinas clássicas e similares

As SVMPs da classe P-II sofrem um processamento de hidrólise, através do qual é retirado o domínio catalítico chamado de desintegrina clássica, neste caso conhecida como desintegrina clássica. As desintegrinas apresentam geralmente uma sequência RGD responsável pela ligação à integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  de plaquetas, inibindo assim a agregação plaquetária pela via ADP, e a inibição do processo metastático tumoral ocorre pela antagonização das integrinas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_3$  receptoras de proteínas da MEC como o fibrinogênio, fibronectina, fator de von Willebrand e vitronectina. As desintegrinas-RGD podem ser classificadas de acordo com seu tamanho e número de cisteína em quatro grupos (DANEM e cols, 1998; MCLANE e cols 1998). O primeiro grupo inclui desintegrinas curtas de 41-51 resíduos e 4 pontes dissulfeto. O segundo grupo é mais abundante e é formado por desintegrinas médias que contêm aproximadamente 70 resíduos e 6 pontes dissulfeto. O terceiro grupo está formado por desintegrinas longas com 84 resíduos e 7 pontes dissulfeto. O quarto grupo é composto de desintegrinas diméricas, onde cada unidade contém aproximadamente 67 resíduos e 10 cisteínas na formação de 4 pontes intracadeia e 2 pontes intercadeia (CALVETE e cols, 2000). As desintegrinas foram descritas por inibirem processos como agregação plaquetária, adesão celular, angiogênese e conseqüentemente o crescimento tumoral. O peptídeo RGD foi descrito por Huang e cols (1991), e a denominação “desintegrina” foi proposta por Gould e cols (1990) após análise das sequências e a atividade inibitória da agregação plaquetária de mais de 14 diferentes desintegrinas RGDs. Em 1994 surgiram os primeiros trabalhos relacionados à atividade das desintegrinas com a inibição da adesão celular de linhagens tumorais como a triflavina (SHU e cols, 1994) e a contortostatina (TRIKHA e cols, 1998) provenientes dos venenos das serpentes *Trimeresurus flavovindis* e *Agkistrodon contortrix* respectivamente.

Algumas desintegrinas purificadas de veneno já tiveram suas estruturas elucidadas, como a salmosina (SHU e cols, 2003), echistatina (ATKINSON e cols, 1994) e acostatina (MOISEEVA e cols, 2008). Os estudos feitos com essas desintegrinas-RGD mostraram a importância das pontes dissulfeto para manter a estabilidade da proteína e também a exposição da trinca de aminoácidos RGD, responsável pelo reconhecimento e antagonização de integrinas específicas.

As metaloproteinases de veneno da classe P-III são as mais hemorrágicas (BJARNASON e FOX, 1994; FOX e SERRANO, 2008) e apresentam o domínio desintegrina-ECD. Este domínio está covalentemente ligado ao domínio rico-em-

cisteína e o complexo formado por estes dois domínios (des-cis) parece potencializar a atividade hemorrágica, embora não se tem evidência direta de sua participação. A hemorragia é comumente relacionada com a atividade proteolítica, uma vez que a quelatação do íon zinco abole tanto a proteólise como os efeitos hemorrágicos (BJARNASON e FOX, 1994). É interessante notar que os venenos apresentam também metaloproteinases desprovidas de atividade hemorrágica. Alguns trabalhos têm identificado os domínios catalíticos que parecem essenciais para exercer esta atividade (HITE e cols, 1992; TAKEYA e cols, 1990).

Tem sido claramente demonstrado que as metaloproteinases com atividade hemorrágica degradam laminina, fibronectina, colágeno IV *in vitro* (MARUYARNA e cols, 1992). A hemorragia parece estar estreitamente relacionada com a hidrólise do colágeno do tipo IV, uma vez que metaloproteinases não hemorrágicas não conseguem hidrolisar esta molécula. Adicionalmente as metaloproteinases pertencentes à classe P-III agem nas células endoteliais dos capilares ocasionando lesões das quais os eritrócitos e outros componentes do sangue escapam ao espaço intersticial (MCKAY e cols, 1970; OWNBY e cols, 1978).

O domínio catalítico é comumente responsável pela atividade hemorrágica, e os domínios ECD-desintegrina/rico-em-cisteína (des-cis) pela inibição da agregação plaquetária. Entre as SVMPs da classe P-III, a jararagina, proveniente da serpente *B. Jararaca* vem sendo muito estudada (MOURA-DA-SILVA e cols, 2001). A inibição da agregação plaquetária dependente de colágeno por parte da jararagina e as demais metaloproteinase do tipo P III é um fato. No entanto, a região ou domínio responsável por esta atividade e o mecanismo de ação ainda não estão esclarecidos. Da jararagina sabemos que inibe a agregação plaquetária induzida por colágeno IC<sub>50</sub> de 40 nM (KAMIGUTI e cols, 1996) e a ligação de células  $\alpha$ 2-K562 expressando a integrina  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 ao colágeno (MOURA-DA-SILVA e cols, 2001). Com respeito às regiões responsáveis pela inibição da agregação plaquetária dependentes de colágeno, sabe-se que o fragmento recombinante correspondente aos domínios des-cis conserva atividade inibitória da agregação plaquetária (MOURA-DA-SILVA e cols, 2001). Porém, as desintegrinas-ECD são encontradas na natureza conjugadas ao domínio cisteína (des-cis), ou seja, o que se pode encontrar como produto da hidrólise de SVMPs da classe P-III e IV é uma molécula que contém conjugados os dois domínios e, portanto, até o momento domínio desintegrina-ECD não é encontrado livre como as desintegrinas clássicas.

Trabalhos utilizando peptídeos sintéticos mostraram que o motivo de adesão está localizado no *loop* correspondente ao domínio ECD (KAMIGUTI e cols, 1997). O domínio desintegrina-símile, por não ser encontrado naturalmente livre no veneno como produto de hidrólise das metaloproteinases, tem seu estudo dificultado. Uma estratégia utilizada para a caracterização biológica desse domínio foi o uso da biotecnologia para a produção de uma desintegrina-símile em levedura *Pichia pastoris* por meio de técnicas de recombinação gênica (HIGUCHI, 2009). De acordo com o mesmo autor a desintegrina-símile recombinante, obtida utilizando-se cDNA de glândula de veneno da *Bothrops leucurus* possui 98% de homologia com o domínio desintegrina da jararagina, uma metaloproteinase da classe P-III do veneno da serpente *B. jararaca*. Essa proteína recombinante foi produzida, utilizando o sistema *Pichia pastoris* e foi denominada leucurogina.

### 1.10 Leucurogina

Higuchi (2009), desenvolveu os trabalhos de clonagem e produção da leucurogina em *P. pastoris* utilizando metanol como agente indutor da expressão. Purificou a proteína em cromatografia de troca iônica e caracterizou a proteína utilizando a técnica de Western blotting com anticorpo anti-jararagina. Foram realizados testes *in vitro* de viabilidade celular utilizando as linhagens de células normais V79 e fibroblasto murino e células tumorais melanoma B16F1 e B16F10. Nestes ensaios os resultados mostraram que a leucurogina apresentou maior efeito citotóxico em células tumorais do que nas células normais. Ensaio de inibição da adesão também foram realizados utilizando células de fibroblasto de humano na presença de colágeno do tipo I e fibronectina. Os grupos de células que ficaram em contato com colágeno e depois tratados com leucurogina apresentaram uma redução significativa no processo de adesão. Não foram observadas diferenças significativas no grupo de fibroblasto que ficaram em contato com fibronectina e tratadas com leucurogina. Esses resultados indicaram que essa proteína recombinante atua em receptores dependentes de colágeno do tipo I, descartando a possibilidade da interação da leucurogina com a fibronectina e seus receptores, as integrinas  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (HIGUCHI, 2009).

Foi verificada também a capacidade da leucurogina em inibir o processo de agregação plaquetária. O objetivo desse ensaio *in vitro* foi analisar a especificidade

da proteína recombinante com as integrinas expressas nas membranas das plaquetas e que participam do processo de agregação. Foi utilizado colágeno tipo I, que é descrito por induzir a agregação plaquetária via integrinas  $\alpha_2\beta_1$  e  $\alpha_1\beta_1$  ou também a utilização de ADP, descrito por induzir a agregação plaquetária via integrinas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_3$  (HIGUCHI, 2009). Os resultados deste ensaio demonstraram que plaquetas, quando incubadas com leucurogina nas concentrações de 0,63  $\mu\text{M}$  a 1,3  $\mu\text{M}$  e posteriormente com o agonista colágeno do tipo I, tiveram a agregação inibida. Na concentração de 0,65  $\mu\text{M}$  a leucurogina foi capaz de inibir a agregação plaquetária em 50% e praticamente em 100% na concentração de 1,3  $\mu\text{M}$ . A inibição não foi observada, quando foi utilizado o ADP como agonista do processo.

Em estudo *in vivo*, a leucurogina mostrou ser capaz de inibir o crescimento tumoral de Ehrlich. Em ensaios utilizando células tumorais de melanoma, a leucurogina na dose de 7,5  $\mu\text{g}/48\text{h}$  também apresentou atividade reduzindo a massa tumoral em aproximadamente 51% (HIGUCHI, 2009). Os resultados preliminares *in vitro* e *in vivo* com a leucurogina mostraram que essa proteína inibiu fortemente a agregação plaquetária, adesão de células com colágeno tipo I e reduziu significativamente o crescimento tumoral. Entretanto, muitos estudos ainda precisam ser realizados para melhor caracterizar sua atividade biológica. Por isso, o objetivo desse trabalho foi testar a atividade anti-angiogênica da leucurogina e anti-metastática.

## II. Objetivos

### 2. Geral

Caracterizar a ação anti-angiogênica e anti-metastática da leucurogina, uma desintegrina - símile do veneno da serpente *B. leucurus*.

#### 2.1 Específicos

- Expressar leucurogina utilizando o sistema *Pichia pastoris*;
- Clarificar a proteína e desenvolver experimentos para verificação da atividade da leucurogina sobre o processo angiogênico e metastático;
- Realizar experimentos in vivo e in vitro para determinar o mecanismo do efeito anti-angiogênico e anti-metastático utilizando células endoteliais e tumorais.



### III. Método

#### 1. Equipamentos utilizados

- Autoclave linha SD, Phoenix;
- Balanças AS 1000C Marte e Adventurer OHAUS;
- Câmara de Neubauer Laboroptik Modelo 1100000
- Câmera Sony Cyber-Shot;
- Centrífugas 5810R e MiniSpin, Eppendorf;
- Cuba de eletroforese, Biômetra;
- Espectrofotômetros Femto, modelo 800XI e Titertek Multiscan;
- Estereoscópio Binocular 20x e 40x TIM-30 - Anatomic Hexasystems;
- Fermentador BioFlo 110 da New Brunswick Scientific
- Fluxo Lamim Air HB 2448.
- Fonte de eletroforese 300, BioAgency;
- Homogeneizador básico Ultra Turrax IKAT 18;
- Incubadora Heraeus Instruments 6000;
- Leitor de Elisa, 1420 Multilabel counter, PerkinElmer presisaly;
- Microscópio Nikon TMS;
- Osmose reversa e deionizador de água Milliopore Milli Q Academic B8EM23173A;
- pHmetro básico Occumet AB15, Fisher Scientific;
- Sistema de filtração tangencial em fibra oca, QuixStand, Benchtop System;
- Sistema FPLC, Pharmacia Biotech;
- Termomixer 5436, Eppendorf;

#### 2. Animais

Nos experimentos de caracterização da atividade de inibição do crescimento tumoral foram utilizados camundongos *Swiss* machos, com idade entre 6 a 8 semanas, com peso aproximado de 30 g, provenientes do Biotério da Universidade de Mogi das Cruzes - UMC. Também foram utilizados camundongos C57, machos com 2 meses de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Microbiologia

Imunologia e Parasitologia – Unifesp. Os animais foram mantidos em caixas com livre acesso à ração e água. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Mogi das Cruzes (anexo 1).

### 3. Linhagens celulares

- *Melanoma murino* B16F10 nex-2 e *Célula endotelial umbilical humana* - HUVEC – Dra. Thaysa Paschoalin, Departamento de Microbiologia Imunologia e Parasitologia – Unifesp.
- *Tumor de Ehrlich* – Professor Dr. Jorge Luiz Pesquero, Departamento de Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais.

### 4. Colunas cromatográficas e placas para cultivo celular

- Coluna de troca-iônica Q-Sepharose (General Electric);
- Placas e microplacas de cultivo celular de 96 cavidades (Falcon, Becton Dickinson Labware).

### 5. Expressão da leucurogina

Os clones positivos de *P. pastoris*, capazes de expressar a leucurogina foram confirmados por PCR (HIGUCHI, 2009). Para o início deste trabalho, essas leveduras positivas foram crescidas em placa contendo meio de cultura YPD por 48 horas e transferidos para 2 erlenmeyers de 1 L contendo (cada) 250 mL de meio BMGY (Anexo B). O meio de cultura contendo as leveduras foi incubado a 30° C, a 250 rpm, por 24 horas, quando o volume total foi transferido para biorreator de 14 L contendo 3000 mL de meio basal de sais (CHENG e cols, 1997), solução de traços de minerais (PTM1) e glicerol (40 g/L) (anexo 2). O pH foi mantido em 5 pela adição de uma solução de hidróxido de amônio 7% (v/v) ou ácido clorídrico 2 M. O meio foi alimentado com glicerol 50% (v/v) contendo 12 mL de PTM1 por litro até que a biomassa atingisse em torno de 200 g de massa úmida por litro quando iniciou-se o processo de indução. O processo de indução com meio composto de metanol (100%) mais PTM1 12 mL/L foi dividido em 3 fases: 24 h de indução com adição do metanol/PTM1 em fluxo de 1 mL/L/h, 24 horas em fluxo de 2 mL/L/h e 24 horas em

fluxo de 3 mL/L/h. Foram coletadas amostras em 12, 24 e 48h de indução. As amostras coletadas foram posteriormente analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS.

## **6. Clarificação da proteína**

Terminado o período de indução, o fermentado foi centrifugado a 9000xg a 5° C e as leveduras descartadas. O sobrenadante foi transferido para um sistema de fibra oca (hollow-fiber, Amersham/GE Healthcare). Nesse processo o sobrenadante foi concentrado e procedido feito a retirada de sais utilizando NaCl 0,9 % (m/v). Logo após o término deste processo, o conteúdo protéico concentrado foi submetido à diálise com membrana de celulose contendo poros de tamanho de 32 mm (Sigma - Aldrich) contra tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,4 por aproximadamente 24h. Os protocolos dos tampões utilizados nas cromatografias estão descritos no anexo B.

## **7. Cromatografia de troca iônica**

A coluna utilizada para cromatografia de troca iônica foi empacotada com Q-sepharose (0,5 x 2,0 cm). A coluna foi equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,4. O concentrado protéico anteriormente dialisado foi aplicado na coluna. Após aplicação da amostra a coluna foi lavada com tampão até densidade óptica zero. Em seguida foi aplicado ao tampão Tris, de forma isocrática, NaCl nas seguintes concentrações: 200, 300, 500 e 1000 mM. O volume de tampão contendo o sal aplicado na coluna foi definido pela densidade óptica, ou seja, a coluna foi lavada até densidade óptica próxima de zero. Foram coletadas frações de 1,0 mL, sendo a eluição das proteínas monitoradas por leitura de absorbância em 220 nm.

## **8. Dosagem de proteínas**

O conteúdo protéico das amostras foi estimado utilizando-se o método descrito por Bradford (1976). Uma curva foi construída com padrões contendo 0, 1, 2, 5, 10 µg de soroalbumina bovina (BSA). Sobre a amostra e os padrões foram adicionado água para normalizar o volume a 200 µL em seguida 1 mL de reagente de cor contendo coomassie blue G-250 (Proteoquant, Proteobras, Mogi das Cruzes,

SP). A mistura foi agitada em vórtex e após um período de repouso de 20 minutos, a leitura foi realizada a 595 nm.

## **9. Eletroforese analítica em gel de poliacrilamida**

Todas as soluções utilizadas para eletroforese em gel de poliacrilamida estão descritas no anexo 3. Inicialmente o gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) foi submetido à pré-corrída por 30 minutos 60 V. As amostras foram aquecidas em banho seco a 95°C por 5 minutos, centrifugadas e aplicadas no gel. Em seguida iniciava-se corrida eletroforético, sob tensão de 120 V, e uma corrente de 30 mA. As massas moleculares das enzimas foram determinadas por comparação de seus fatores de migração com de proteínas de massas moleculares conhecidas padrão (Bench Marck Protein Ladder, Life Technologies, com tamanhos de 10 a 200 kDa).

## **10. Coloração por prata**

Após a corrida eletroforética, o gel foi pré-fixado por 60 min, seqüencialmente em cada uma das soluções contendo metanol, ácido acético glacial e água deionizada nas proporções de 100:15:85 e 10:15:175. Em uma terceira etapa de fixação, o gel foi imerso em solução de glutaraldeído a 10% (v/v) durante 60 min. Após este tempo, o gel foi lavado com água deionizada por 45 minutos, sendo realizadas trocas de água a cada intervalo de 5 minutos. Terminado o procedimento de lavagem, o gel foi mergulhado em solução de nitrato de prata por 30 minutos (Prata tamponada, Proteobrás, Mogi das Cruzes, SP). Ao término deste período o gel foi lavado com água deionizada por 15 minutos, sendo trocada a água a cada 5 minutos. A seguir o gel foi submetido ao processo de revelação em solução de ácido cítrico  $5,7 \times 10^{-4}$  M contendo 0,1% (v/v) de formaldeído. O processo de revelação foi interrompido pela transferência do gel para uma solução de ácido acético a 1% (v/v).

## **11. Cultivo celular**

As células B16F10 nex-2 e HUVEC foram cultivadas em meio RPMI 1640, a 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), contendo 2 mM de glutamina, 1% de aminoácidos não essenciais e 100 U por mL de penicilina e estreptomicina. Todas as células foram incubadas em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, no escuro. Antes de atingirem confluência as células foram subcultivadas da seguinte forma:

1. Inicialmente foram lavadas com PBS;
2. Adicionou-se uma solução de PBS-EDTA 0,1 mM;
3. Após o descolamento das células da superfície da garrafa, foi feita a inativação do quelante de Ca<sup>2+</sup> pela adição de meio de cultura. As células em suspensão foram distribuídas para novas garrafas ou placas nas densidades desejadas ou ainda estocadas em nitrogênio líquido (na presença de DMSO 10% (v/v) e de SFB 30% (v/v)).

## **12. Estudo da viabilidade celular**

Células endoteliais vasculares umbilicais de humano (HUVEC) e células tumorais de melanoma murino B16F10 nex-2 (5x) foram distribuídas em microplacas de 96 cavidades (5x10<sup>3</sup> células/poço). Após a adesão celular, leucurogina foi adicionada nas concentrações 1; 3; 5; 12,5; 25 e 50 µg/mL. Como controle as duas linhagens celulares foram crescidas na ausência da leucurogina. Em seguida a placa foi mantida a 37°C e CO<sub>2</sub> 5%. O ensaio foi realizado em quadruplicata e a leitura espectrofotométrica a 570 nm foi realizada após 96 horas de tratamento, sendo o MTT adicionado 4 horas antes das leituras (10 µL; 0,05 mg/cavidade). Os cristais de formazan formados, devido à metabolização do MTT, são insolúveis em meio aquoso e, por isto foram solubilizados, antes das leituras, em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), sendo o meio de cultura retirado antes da adição deste solvente (Mosmann, 1983).

### **13. Estudo da angiogênese *in vitro***

Matrigel foi descongelado em gelo e 15  $\mu$ L foram distribuídos em placas de 96 poços. Em seguida a placa permaneceu por 1 h a 37°C e CO<sub>2</sub> 5%. HUVEC ( $5 \times 10^3$  células/poço) foram ressuspensas em 100  $\mu$ L de meio RPMI suplementado com 0,2% de soro fetal bovino (SFB) e adicionado em cada poço na presença e ausência de leucurogina. O ensaio foi feito em quadruplicata utilizando diferentes concentrações da proteína recombinante (10, 25 e 50  $\mu$ g/mL). Foram feitos dois grupos controles. O primeiro, HUVEC foram crescidas na presença de matrigel (controle positivo). O segundo grupo controle, HUVEC cresceram sem adição de matrigel (controle negativo). Células de ambos grupos controles cresceram na ausência da leucurogina. A placa foi mantida em 37°C e CO<sub>2</sub> 5% por 18 h e as imagens foram capturadas em 8x (Câmera Sony Cyber-Shot acoplada ao microscópio). Os números de estruturas pró-angiogênicas foram contados nos quatros diferentes poços e o valor da média foi determinado para cada amostra.

### **14. Proliferação celular**

Células tumorais de melanoma murino B16F10 nex-2 e HUVEC ( $5 \times 10^3$  células/poço) foram distribuídas em microplacas de 96 cavidades. Após a adesão celular, os grupos tratados receberam diferentes concentrações de leucurogina (10, 25 e 50  $\mu$ g/mL) na ausência e presença de 10 ng/mL de FGF 8b (B16F10) e 2 ng/mL FGF básico (HUVEC). Foram feitos dois grupos controles. No primeiro, células B16F10 e HUVEC foram plaqueadas na ausência de leucurogina e FGF (controle negativo). Já no segundo grupo as duas linhagens celulares cresceram na presença somente de FGF (controle positivo). Em seguida a placa foi mantida a 37°C e CO<sub>2</sub> 5%. O ensaio foi feito em quadruplicata e a proliferação das células foi mensurada utilizando MTT. A leitura espectrofotométrica a 570 nm foi realizada após 24 horas de tratamento.

### **15. Ensaio *in vivo* da inibição do crescimento tumoral**

*Ehrlich* - Para a inoculação do tumor sólido de Ehrlich foram coletadas células do líquido ascítico de camundongos transplantados há 7 dias com o tumor na cavidade abdominal. Estas células foram centrifugadas e depois ressuspensas com solução salina 0,9%, a temperatura ambiente, o que foi repetido por 3 vezes. O volume para ressuspensão foi sempre igual ao volume anterior à centrifugação. A seguir foi realizada a contagem do número de células viáveis, em câmara de Neubauer, através de diluição das células e utilização de azul de Tripán como corante. A partir deste resultado foram inoculadas, via subcutânea, um total de  $2,5 \times 10^6$  células vivas no dorso de cada camundongo *Swiss*, machos de 2 meses de idade.

*Melanoma murino B16F10 nex-2* – Células de melanoma murino foram cultivadas em placa em meio RPMI acrescido de 10% de soro fetal bovino. A placa permaneceu a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem confluência. As células foram lavadas com PBS, seguido de ressuspensão em PBS contendo EDTA 0,1mM. Em seguida foi adicionado meio RPMI e as células centrifugadas a 1.000xg, sob temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir foi realizada a contagem do número de células viáveis, em câmara de Neubauer, através de diluição das células e utilização de azul de Tripán como corante. Para a inoculação,  $5 \times 10^4$  células foram injetadas na veia caudal de camundongos C57B6 machos de 2 meses de idade.

### *Tratamento*

*Ehrlich* - O tratamento dos animais com tumor de Ehrlich foi iniciado após 7 dias da inoculação das células tumorais e prolongou-se por 7 dias. O grupo tratado (n = 10) recebeu injeções diárias de 10 µg/animal de leucurogina pela via subcutânea. O grupo controle (n = 10) recebeu doses diárias de 100 µL de salina 0,9%. No 8º dia, os animais foram sacrificados, o tumor foi retirado e pesado.

*Melanoma murino B16F10 nex-2*. Após 24h do implante do tumor os animais foram divididos em dois grupos (n = 6). Em um dos grupos os animais foram tratados com injeção intraperitoneal de 5 µg/animal de leucurogina, em dias alternados durante 15 dias. Os animais pertencentes ao grupo controle (n = 8) foram tratados com 100 µL de PBS. No 16º dia os animais foram sacrificados e os pulmões foram retirados. A massa pulmonar foi mensurada, seguido da contagem dos nódulos. A contagem dos nódulos foi realizada com o auxílio de um estereoscópio binocular.

## 16. Angiogênese inflamatória com uso de matriz de esponja

Camundongos Swiss foram anestesiados com ketapum (ketamina 140 mg/kg, adicionado de xilazina 7 mg/kg), submetidos à tricotomia e à assepsia da região dorsal. Logo em seguida, foi realizada uma pequena incisão em torno da 10<sup>a</sup> vértebra lombar de aproximadamente 1 cm. Por esta incisão foi introduzida uma tesoura de ponta romba com a qual procede-se ao divulsionamento do tecido subcutâneo formando um caminho até a altura das vértebras cervicais onde será fixado o disco de esponja. Discos de esponja de poliéster poliuretano de 8 mm de diâmetro por 5 mm de espessura foram implantados centralmente. Antes do implante dos discos, estes foram lavados em água destilada e submetidos à fervura por 15 minutos. Após a cirurgia, os animais foram mantidos sob aquecimento artificial até completo restabelecimento de suas funções vitais.

### *Tratamento*

Após 24h do implante dos discos de esponjas, os animais foram divididos em grupos (n = 3) totalizando 7 grupos. Foram utilizadas duas vias de injeção, intraperitoneal e aplicações diretamente na esponja. Os grupos tratados intraperitonealmente receberam doses diárias de leucurogina nas concentrações de 10 e 25 µg/animal. Para esta via de tratamento o grupo controle recebeu doses diárias de 100 µL de salina 0,9%. Os grupos que receberam injeções de leucurogina diretamente no implante de esponja as concentrações de proteína foi de 10, 25 e 50 µg/animal. Para esta via de tratamento o grupo controle também recebeu doses diárias de 100 µL de salina 0,9%. No 16<sup>o</sup> dia os animais foram sacrificados, os implantes retirados, pesados e homogeneizados para determinação dos níveis de hemoglobina.

## 17. Dosagem de hemoglobina

Após o sacrifício dos animais, as esponjas foram removidas. Cada esponja foi homogeneizada durante 20 min em temperatura ambiente. Para cada 0,5 g de tecido utilizou-se 2 mL de reagente de cor de hemoglobina (DRABKIN e AUSTIN,



1932). Após centrifugação a 10000xg durante 20 minutos, a temperatura ambiente, o sobrenadante foi filtrado (0,22  $\mu\text{m}$  – Millipore) e para posterior leitura espectrofotométrica a 540 nm.

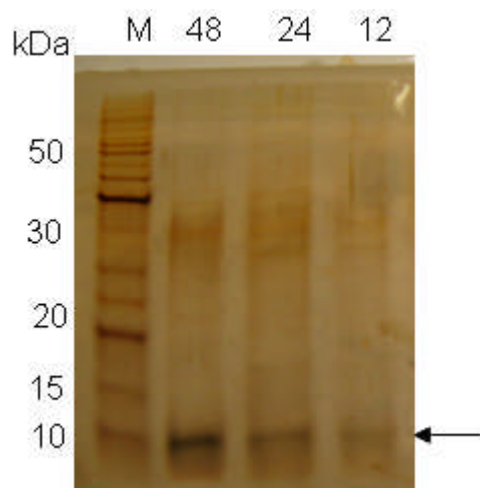
## **18. Análise estatística**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro da média (epm) de cada grupo de animais. Os resultados foram analisados utilizando os testes paramétricos teste t e ANOVA. Os valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## IV. Resultados

### 1. Expressão da leucurogina

A levedura *P. pastoris* que apresentou no seu genoma a sequência do cDNA da leucurogina (HIGUCHI, 2009), foi selecionada para o processo de indução, ou seja, expressão da proteína de interesse induzida pela adição de metanol no meio de cultura. Os clones positivos foram utilizados para produção da leucurogina em grande escala, em sistema de fermentação em dornas de 14 L. A figura 7 mostra o perfil da leucurogina coletada em 12, 24 e 48h de indução. Foi observada a ocorrência da expressão da proteína de massa molecular esperada (entre 10 e 11 kDa).

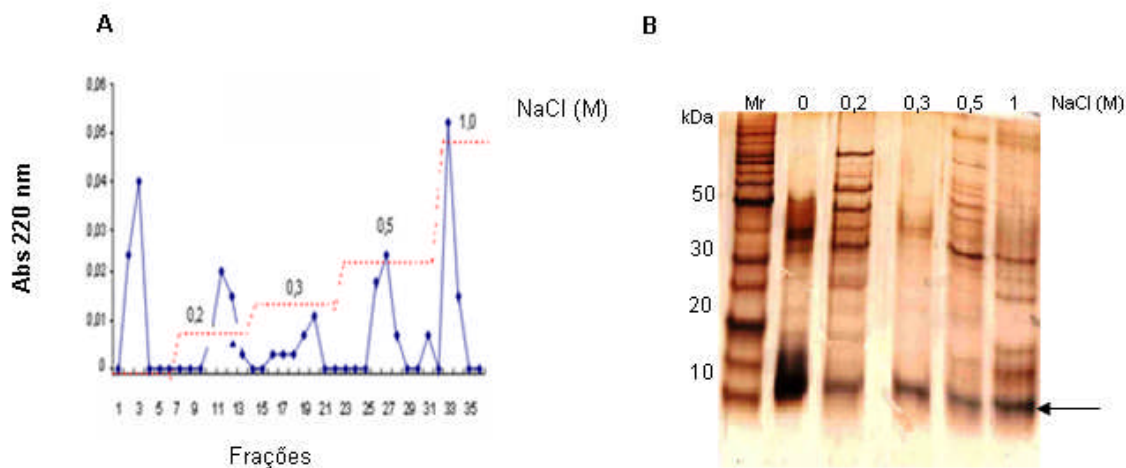


**Figura 7.** Perfil de expressão da leucurogina pela *P. pastoris* após indução com metanol. Eletroforese em SDS-PAGE 12,5% corado com prata. Foram aplicados 2  $\mu$ g de proteína de amostras coletadas nos tempos 12, 24 e 48 h de indução. M, marcador de massa molecular (BenchMark Protein Ladder, Invitrogen). A seta indica a banda referente à leucurogina.

### 2. Clarificação da leucurogina

Após a indução da leucurogina, a mesma foi clarificada e concentrada utilizando sistema de filtração tangencial (fibra oca) e após quantificação protéica (0,5 mg/mL) a amostra foi dialisada contra tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e aplicada em coluna Q-Sepharose (0,5 x 2,0 cm) que foi equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,4. O resultado da cromatografia está mostrado na figura 8A. Os tubos de maior densidade óptica de cada pico foram juntados e amostras contendo 2  $\mu$ g de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida para eletroforese para verificar a

posição de eluição da leucurogina. A figura 8B mostra o resultado obtido na eletroforese.



**Figura 8. A** - Perfil cromatográfico obtido em coluna Q-sepharose (0,5 x 2 cm). Os números sobre a linha pontilhada representam a concentração de NaCl aplicada ao tampão de eluição. Abs, absorbância em 220 nm. **B** - Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12,5% corado com prata, mostrando o perfil de eletroforético das amostras coletadas em diferentes estágios da cromatografia por troca iônica. Mr, marcador de padrão de massa molecular (Bench Mark Protein Ladder, Invitrogen). A seta indica a posição da leucurogina.

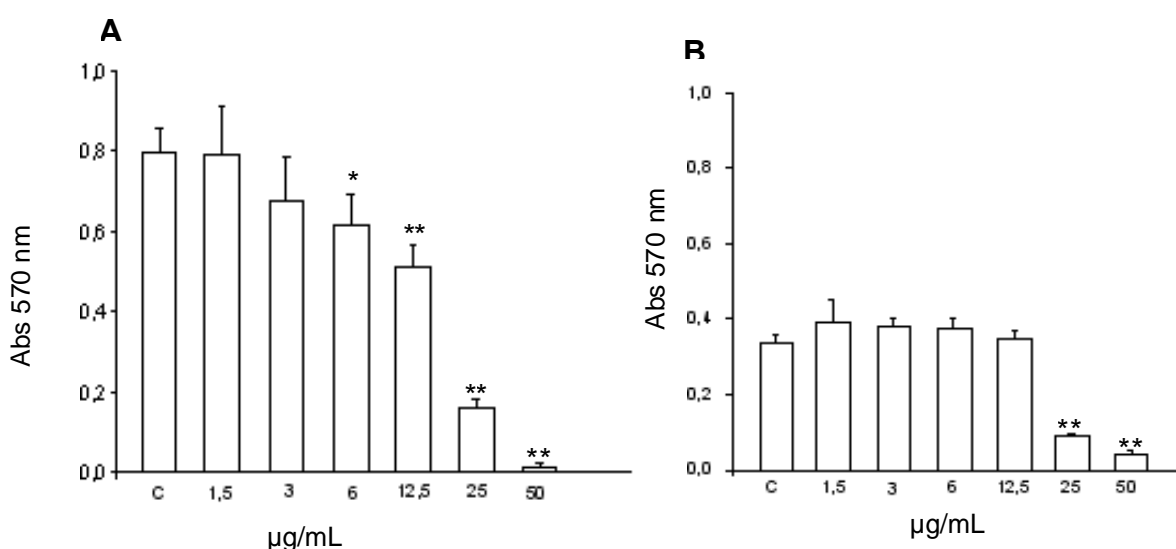
É possível observar no resultado da eletroforese que a leucurogina está presente em todos os picos. No entanto, na presença de 0,3 M de NaCl a leucurogina foi eluída com maior grau de pureza. O material obtido na eluição a 300 mM de NaCl na cromatografia de troca iônica foi utilizado para os ensaios biológicos.

### 3. Estudo *in vitro*

#### 3.1 Análise da citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade celular foram os primeiros ensaios biológicos realizados nesse trabalho para determinar a ação da leucurogina. O objetivo deste foi avaliar a ação dessa proteína sobre as linhagens de células endoteliais umbilicais humanas – HUVEC e em células de melanoma murino – B16F10, sendo esta última altamente agressiva e metastática para camundongos. Essa avaliação foi feita porque posteriormente ambas linhagens seriam utilizadas para outros estudos. Iniciou-se esse teste distribuindo  $5 \times 10^3$  de células HUVEC e B16F10 em placas de 96 cavidades. Após a aderência dessas no substrato (placa) a leucurogina foi

adicionada em diferentes concentrações (entre 0 a 50  $\mu\text{g/mL}$ ). Após 24h de incubação foram adicionados nos poços o reagente MTT e leitura espectrofotométrica a 570 nm foi realizada para determinar a taxa de viabilidade celular. Os resultados mostraram que para as células B16F10 a leucurogina apresentou ser citotóxica a partir da ordem de 6  $\mu\text{g/mL}$ . Analisando o resultado apresentado na figura 9A, foi verificado que para células de melanoma o efeito citotóxico elevou-se de acordo com o aumento da concentração de leucurogina. Já para a linhagem de células endoteliais – HUVEC, a leucurogina apresentou efeito citotóxico significativo a partir da concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$  (figura 9B).

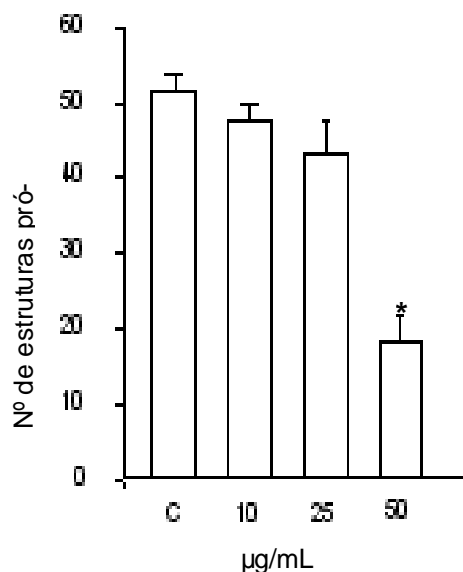


**Figura 9.** Análise da citotoxicidade da leucurogina sobre as células de melanoma murino B16F10 (A) e células endoteliais umbilicais de humano - HUVEC (B). As duas linhagens foram distribuídas em microplacas de 96 cavidades contendo  $5 \times 10^3$  células por cavidade. Após adesão celular, a proteína recombinante foi adicionada nas concentrações entre 0 a 50  $\mu\text{g/mL}$ . Foi utilizando ensaio MTT para verificação da viabilidade. A leitura espectrofotométrica foi a 570 nm.

### 3.2 Estudos de angiogênese

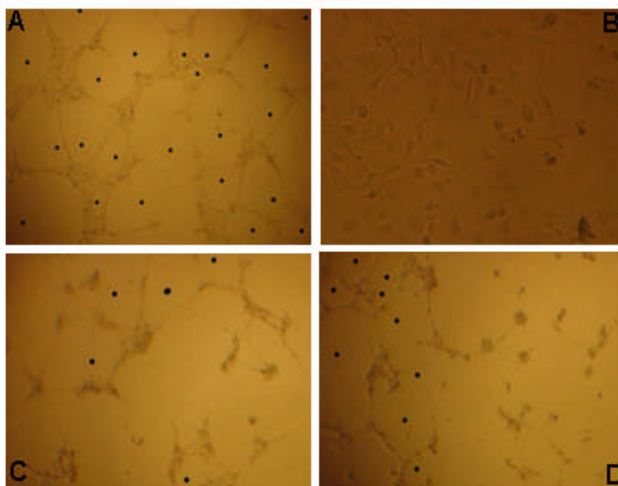
A determinação da atividade anti-angiogênica é uma etapa muito importante na caracterização de biológica de proteínas recombinantes desenvolvidas para inibir o crescimento tumoral. O ensaio de angiogênese *in vitro* teve como objetivo verificar se a leucurogina seria capaz de inibir a formação de estruturas pró-angiogênicas que é totalmente dependente de células endoteliais. Para tanto, utilizou-se a linhagem celular HUVEC. Inicialmente matrigel foi adicionada em placas com 96 cavidades. Logo em seguida  $5 \times 10^3$  células (HUVEC) foram distribuídas, seguida da

adição de diferentes concentrações de leucurogina (0, a 50  $\mu\text{g/mL}$ ). Analisando a figura 10, foi possível verificar que a leucurogina na ordem de 50  $\mu\text{g/mL}$  foi capaz de inibir a interação da matrigel às células endoteliais, impedindo a formação dos tubos angiogênicos. Comparando o efeito de inibição apresentado pela leucurogina nessa concentração com o resultado obtido no grupo controle, observou-se uma redução na formação dos tubos de aproximadamente 66%.



**Figura 10.** Angiogênese de HUVEC com adição de matrigel. As células foram incubadas na presença e ausência de diferentes concentrações de leucurogina. Os números de estruturas pró-angiogênicas foram contados após 18h de incubação. \* $p < 0,05$  vs controle.

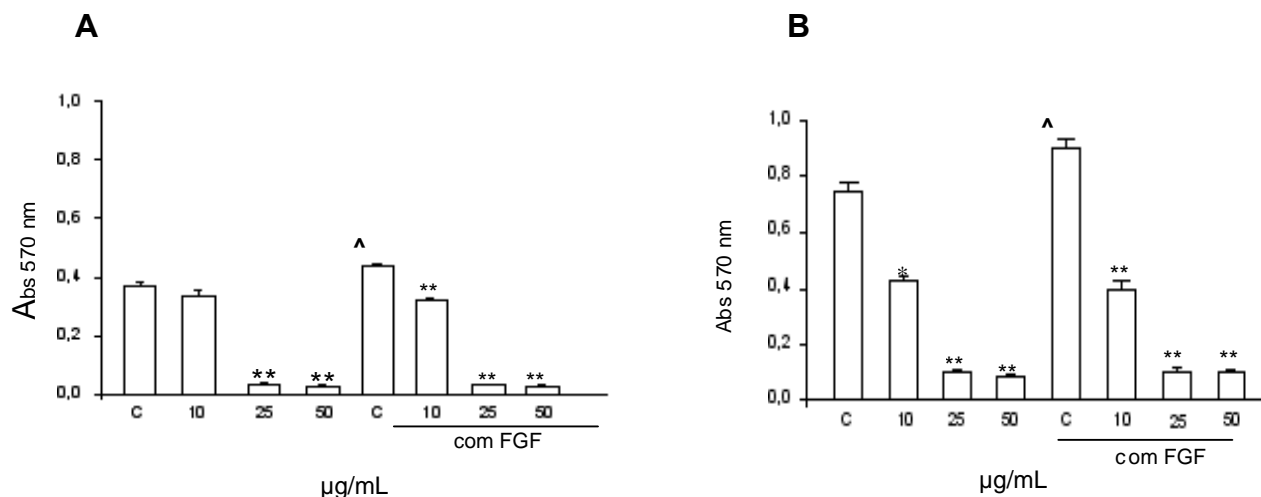
A figura 11 exemplifica, em termos qualitativos, os resultados obtidos neste experimento. Na figura 11A foi possível verificar que HUVEC crescida em matrigel levou a formação de estruturas com compartimento intracelular fechado. O mesmo não foi observado quando HUVEC foi crescida na ausência de matrigel (figura 11B). Já as amostras celulares crescidas na presença da leucurogina (50  $\mu\text{g/mL}$ ) pode ser verificado uma redução significativa na formação das tubos pró-angiogênicas (figuras 11C e 11D).



**Figura 11.** Imagens das estruturas pró-angiogênicas capturadas após de 18 h de cultivo de HUVEC. **A** - controle positivo contendo matrigel. **B** - controle negativo, sem adição de matrigel. **C** e **D** - com matrigel e tratadas com 50 µg/mL de leucurogina. Os pontos escuros representam a contagem das estruturas pró-angiogênicas.

### 3.3 Proliferação celular

Fatores de crescimento são proteínas expressas pelas células com a função de ativar vias de sinalização, dentre essas as de sobrevivência e crescimento celular. O estudo da proliferação de células estimuladas fator de crescimento de fibroblasto foi realizado com objetivo de verificar se a leucurogina seria capaz de antagonizar o crescimento celular. Em tumores, a progressão da malignidade esta diretamente relacionada à proliferação descontrolada de células tumorais. As células endoteliais também contribuem para esse evento por serem responsáveis pela neovascularização tumoral. Por esta razão, células de melanoma murino B16F10 e células endoteliais – HUVEC foram distribuídas em placas de 96 cavidades e após a adesão foram estimuladas à proliferação com FGF. Concentrações crescentes de proteína recombinante (0 a 50 µg/mL) foram adicionadas em cada poço. Analisando as figuras 12A e 12B, se pode observar que os grupos controles das duas linhagens celulares expostas a FGF apresentaram diferenças significativas na proliferação quando comparados aos grupos controles crescidos sem adição de fator de crescimento, mostrando que o FGF atuou induzindo o crescimento das células. Também foi observado que a proliferação celular das duas linhagens na presença de FGF foi inibida pela leucurogina a partir da concentração de 10 µg/mL.



**Figura 12.** Análise da proliferação celular para a linhagem tumoral B16F10 (**A**) e para as células endoteliais HUVEC (**B**). Em placas de cultivo celular contendo 96 cavidades as duas linhagens foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^3$  células por cavidade. As linhagens celulares foram submetidas a diferentes concentrações (entre 0 a 50 µg/mL) de leucurogina na presença e na ausência de FGF 10 ng/mL (**A**) e 2 ng/mL (**B**). Os controles foram preparados na ausência de leucurogina. ^p<0,05 entre os controles, \*p<0,05 vs controle, \*\*p <0,01 vs controle.

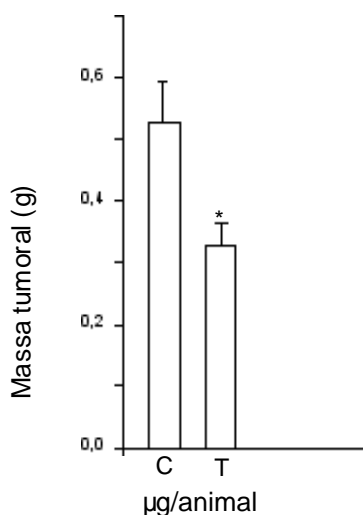
## 4. Estudos *in vivo*

### 4.1 Inibição do crescimento tumoral

Atualmente a cultura celular vem sendo constantemente empregada para avaliar a atividade fármacos sobre diferentes linhagens celulares, incluindo as tumorais. A realização de estudos *in vitro* com a leucurogina foi importante para avaliar sua atividade em células endoteliais (HUVEC) que são requeridas no processo de angiogênico e também em células tumorais (B16F10). Além disso, a caracterização da ação dessa proteína sobre o cultivo dessas duas linhagens, fez-se necessário devido a esses dois tipos celulares estarem descritas por super expressar os maiores receptores de colágeno, tais como as integrinas  $\alpha_1\beta_1$  e  $\alpha_2\beta_1$ . As desintegrina-símiles por suas características, podem atuar inibindo essas integrações. Devido ao fato da leucurogina ter apresentado resultados significativos em estudos *in vitro*, procurou-se desenvolver ensaios *in vivo* para avaliar a atividade dessa proteína sobre o sistema fisiológico. Sendo assim, foi realizado o ensaio de inibição do crescimento tumoral utilizando células de tumoral de Ehrlich. Após serem injetadas as quantidades de  $2,5 \times 10^6$  de células na região dorsal de camundongos, os animais foram divididos em 2 grupos. Passados 7 dias do implante, iniciou-se o



tratamento. O grupo controle recebeu doses diárias de 100  $\mu$ L de solução salina 0,9%. Já os animais do grupo tratado receberam as doses diárias de 10 $\mu$ g/animal de leucurogina. O resultado ilustrado na figura 13 mostrou que os tumores retirados dos animais tratados com a proteína recombinante apresentaram uma redução de massa significativa quando comparados aos tumores retirados dos animais tratados com salina 0,9%. Essa redução foi aproximadamente de 44%.

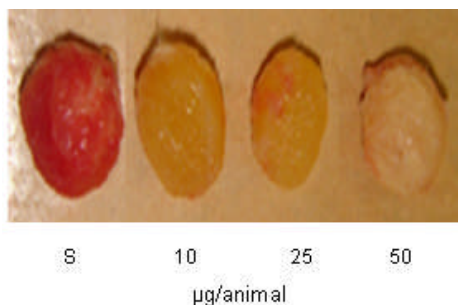


**Figura 13.** Massa tumoral de tumor de Ehrlich crescida no subcutâneo de camundongos *Swiss* machos. C - submetidos à dose diária de 100  $\mu$ L de salina 0,9%. T - animais tratados com 10  $\mu$ g/animal de leucurogina por dia. Os resultados representam a média  $\pm$  epm de cada grupo de animal. \*  $p < 0,05$  vs controle.

## 4.2 Dosagem de hemoglobina das matrizes de esponjas

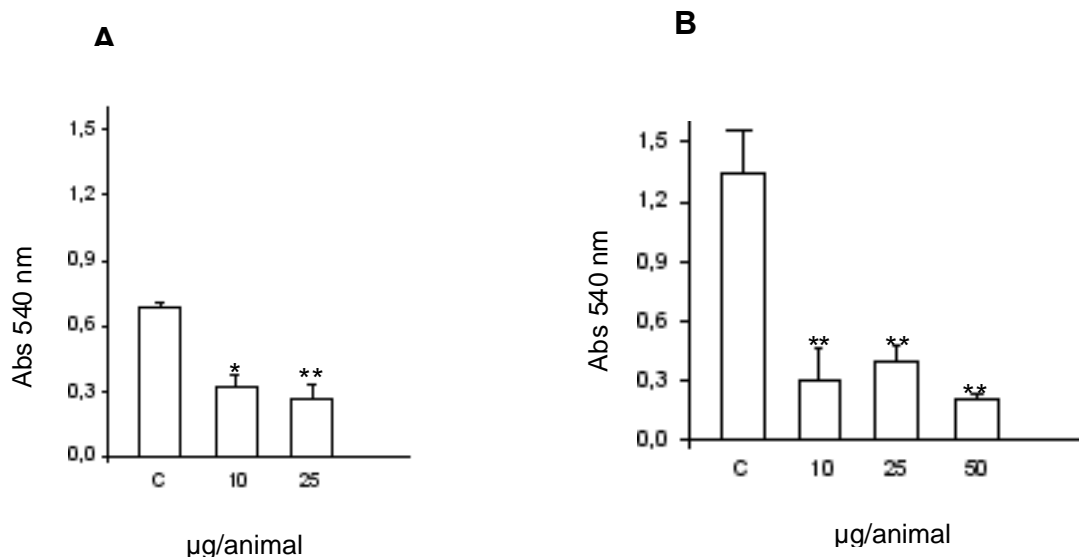
Em estudos de angiogênese *in vitro* a leucurogina mostrou ser capaz de inibir a formação de estruturas pró-angiogênicas, fundamentais para a formação de vasos sanguíneos. Por isso, procurou-se verificar se a leucurogina também seria capaz de reduzir a formação de vasos sanguíneos em matrizes esponjas. Para este ensaio, discos de esponjas foram implantados na região dorsal de camundongos e os animais foram divididos em grupos. Foram utilizadas duas vias de tratamento. Os animais tratados pela via intraperitoneal receberam doses diárias de diferentes concentrações de leucurogina (10 e 25  $\mu$ g/animal). Os animais que receberam doses de leucurogina diretamente no local do implante da esponja foram tratados com proteína nas concentrações de 10, 25 e 50  $\mu$ g/animal. Os grupos controles das duas vias de tratamento receberam injeções diárias de 100  $\mu$ L/animal de salina 0,9%. A figura 14 apresenta as esponjas retiradas do dorso dos animais após 15 dias de

tratamento. Nesta figura pode ser observada a diferença na vascularização das esponjas tratadas com salina 0,9% e as tratadas com concentrações crescentes de leucurogina.



**Figura 14.** Matrizes de esponja retiradas do dorso de camundongos Swiss machos após 15 dias de tratamento. Aplicações feitas diretamente na esponja. As doses diárias foram de 10, 25 e 50 µg/animal de leucurogina. S = controle, no qual foi injetada salina.

Analisando as figuras 15A e 15B, pode ser observado que a quantidade de hemoglobina nas esponjas dos grupos tratados com salina 0,9% é significativamente maior quando comparado à quantidade de hemoglobina dos implantes de esponjas tratadas com leucurogina.

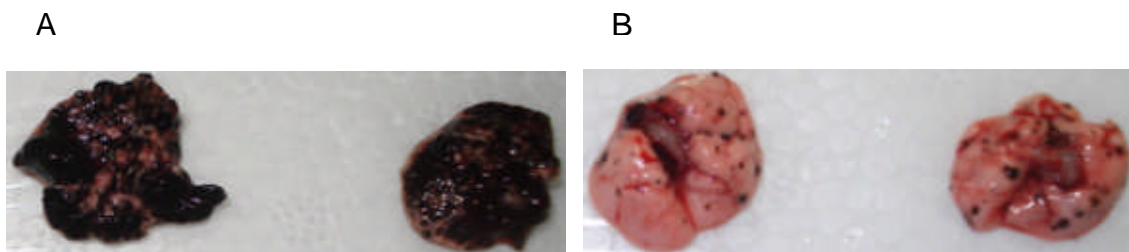


**Figura 15.** Níveis de hemoglobina em matriz de esponja implantada no dorso de camundongos Swiss machos de 2 a 3 meses de idade. **A**, via de tratamento intraperitoneal. **B**, aplicação feita diretamente na esponja. O grupo controle (C) recebeu doses diárias de 100 µL de salina 0,9% (100µL). As doses de leucurogina para os animais tratados foram de 10, 25 e 50 µg/dia por animal. Os animais foram sacrificados no 15º dia após inoculação do tumor. \*p<0,05 vs controle, \*\*p<0,01 vs controle.

É possível observar também que houve redução significativa da vascularização das esponjas tratadas com leucurogina a partir da ordem de 10 µg/animal e as duas vias de tratamento apresentaram resultados significativos, mostrando que a leucurogina foi capaz de inibir aproximadamente em 70% os níveis de neovascularização das esponjas.

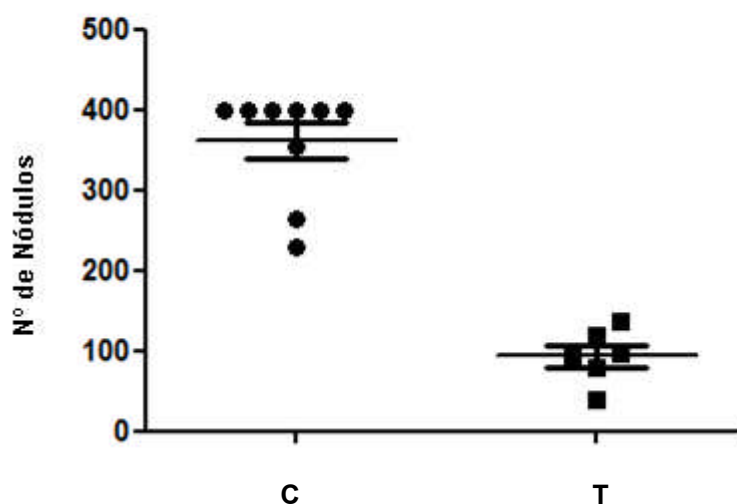
### **4.3 Metástase pulmonar**

Células tumorais naturalmente superexpressam fatores de crescimento que auxiliam no seu desenvolvimento e estimulam a neovascularização para garantir sua sobrevivência no organismo. Pelo fato da leucurogina em ensaio *in vitro* ter apresentado capacidade de inibir proliferação celular na linhagem de melanoma murino B16F10 estimulada com fator de crescimento de fibroblasto, foi proposto também verificar seu efeito sobre metástase tumoral. Nas condições de metástase o estágio da doença é avançado e as células tumorais estão se proliferando descontroladamente. Células de melanoma ao invadirem o sistema circulatório ou linfático, com auxílio de plaquetas aderem-se e invadem outros tecidos e órgãos. Um bom modelo e indicador da progressão do melanoma é a contagem do número de nódulos tumorais presentes nos pulmões de camundongos doentes. Esses nódulos são formados porque células tumorais após entrarem no sistema circulatório têm acesso aos pulmões devido à oxigenação sanguínea, sendo assim, as células tumorais se fixam e invadem esse órgão. Para o início desse ensaio  $5 \times 10^5$  células tumorais (B16F10) foram inoculadas na veia caudal de camundongo C57B16. Os animais foram divididos em 2 grupos e após 24 h iniciou-se o tratamento. Os animais do grupo controle receberam 100 µL de PBS. Os animais do outro grupo receberam a dose de 5 µg de leucurogina. As imagens dos pulmões retirados dos camundongos após 15 dias de tratamento podem ser observadas na figura 16. É possível verificar que nos pulmões dos camundongos controle houve um aumento na progressão de nódulos tumorais, indicando um avanço das células tumorais sobre o organismo do animal. Uma redução no número de nódulos foi observada nos pulmões dos animais tratados com leucurogina.



**Figura 16.** Pulmões de camundongos C57 machos submetidos à inoculação de células de melanoma murino (B16F10) diretamente na veia caudal e tratados com (A) controle PBS (100 $\mu$ L) e leucurogina (5 $\mu$ g/animal) (B) via intraperitoneal em dias alternados.

O número de nódulos foi contado com auxílio de um estereoscópio binocular. O resultado da contagem pode ser analisado na figura 17. Neste resultado observou-se que a leucurogina reduziu significativamente o número de nódulos tumorais, indicando o efeito da redução metástase.



**Figura 17.** Número de nódulos tumorais indicadores de metástase pulmonar de melanoma murino. Células tumorais B16F10 nex-2 ( $5 \times 10^4$ ) foram aplicadas na veia caudal lateral de camundongos C57B16 machos de 2 meses de idade. O grupo controle (C) foi submetido à dose de 100  $\mu$ L de PBS a cada 48 h. Animais do grupo tratado (T) receberam doses de 5  $\mu$ g de leucurogina a cada 48 h. Os animais foram sacrificados no 16º dia após no início do tratamento.

## V. Discussão

As células do corpo de qualquer organismo pluricelular mantêm-se associadas entre si e com material adjacente por meio da matriz extracelular. As adesões celulares são mediadas por moléculas específicas localizadas nas membranas, tais como selectinas, caderinas, membros da super família das imunoglobulinas (Ig), metaloproteinases e integrinas (COMINETTI, 2004). As integrinas estão diretamente envolvidas no processo de sinalização celular (GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1999). De acordo com Hynes (1992), são consideradas como os mais importantes receptores da MEC. Boudreau (1998) mostrou a influência da MEC na sinalização em células malignas. Hoje se sabe quais integrinas são altamente expressas em muitas linhagens tumorais, sendo esta informação essencial para o entendimento do desencadeamento de sinalizações relacionadas ao crescimento, angiogênese e metastização tumoral dependentes de integrinas. Como exemplo, pode ser citado a superexpressão da integrina  $\alpha_v\beta_3$ , receptora de fibronectina, vitronectina entre outros componentes da MEC em algumas linhagens tumorais como melanoma (SHEU e cols, 1994) e câncer de mama (BORRIRUKWANIT e cols, 2007). Outras integrinas que vem sendo mais estudadas e relacionadas a câncer, incluindo melanoma, carcinomas hepatocelular e prostático são  $\alpha_1\beta_1$  e  $\alpha_2\beta_1$ , receptoras do maior componente da MEC, o colágeno. Além disso, a integrina  $\alpha_v\beta_3$  e os receptores de colágeno  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$  mostram também uma importante função no processo angiogênico.

Pelo exposto, o estudo sobre antagonista de integrinas que participam do processo de desenvolvimento tumoral vem sendo umas das alternativas promissoras no tratamento do câncer. Um alvo de estudo são os venenos de serpentes que apresentam uma diversidade de componentes bioativos, entre os fragmentos conhecidos como desintegrinas clássicas e similares, derivadas das SVMPs e descritos por antagonizarem os receptores de membrana, as integrinas (MCLANE e cols, 2004; MINEA e cols, 2005). As desintegrinas clássicas foram descritas por inibirem processos como agregação plaquetária, adesão celular, angiogênese e conseqüentemente o crescimento tumoral. As desintegrina-símiles não são encontradas livres na natureza como produtos de hidrólise. São encontradas apenas conjugadas ao domínio rico em cisteína, ou seja, o complexo des-cis. A principal característica que distingue bem as desintegrinas-símiles é a presença da trinca

ECD substituindo a região RGD das desintegrinas. Usami, (1994), descreveu pela primeira vez, a participação do domínio desintegrina-símile na inibição da agregação plaquetária. Hoje se sabe que além da atividade sobre as plaquetas, podem atuar no recrutamento de neutrófilos, adesão celular, angiogênese, crescimento tumoral. Pelo fato de o domínio desintegrina-símile do veneno da serpente *B. leucurus* não ser encontrado na natureza, e por isso ter seu estudo delimitado, Higuchi (2009), usou como alternativa clonar esse domínio em levedura *P. pastoris*, por meio da tecnologia de DNA recombinante. Após a etapa de clonagem o mesmo autor purificou e testou a atividade dessa proteína recombinante (leucurogina) em ensaios que caracterizam a ação de uma desintegrina, tais como agregação plaquetária, adesão, proliferação e migração celular. Nesses ensaios *in vitro* a leucurogina apresentou atividade biológica significativa. Nos testes de inibição do crescimento tumoral a leucurogina também mostrou ação inibitória. Portanto, o trabalho aqui apresentado teve o objetivo principal expressar, purificar e caracterizar da atividade anti-angiogênica e anti-metastática da leucurogina, dando continuidade aos estudos da ação biológica dessa proteína.

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, que é capaz de crescer em meio de cultura contendo metanol como única fonte de carbono, possui duas características que a tornam uma boa hospedeira para a produção de proteínas heterólogas. A primeira é o forte promotor usado para transcrever genes heterólogos, que é derivado do gene da enzima álcool oxidase (AOX1) e é regulado transcricionalmente por metanol, que é um indutor barato, sendo reprimido na ausência do mesmo. Possui também a capacidade de crescer e atingir altas densidades celulares (>100 g/L) (FISCHER e cols, 1999). A *P. pastoris* contendo o cDNA da leucurogina, e por isso, denominada clone positivo foi crescida em placa e posteriormente transferida para meio denominado meio basal de sais, cuja composição é, conforme a própria denominação, basicamente de sais contendo íons cálcio, magnésio, potássio, ferro, cobalto, manganês, zinco, sódio, cobre e, como fonte de carbono, o glicerol (CHEN e cols, 1997). Este meio não tem componentes orgânicos, o que facilita o processo de purificação e análise do fragmento protéico em eletroforese gel de poliacrilamida. A expressão da proteína em bioreator permitiu o controle de todos os parâmetros, como oxigenação, pH e temperatura, garantindo o sucesso da indução da leucurogina. Logo após a expressão foi realizado o processo de purificação da proteína. De acordo com Higuchi, 2009, o pl estimado para a leucurogina é de 4,1 e

a eluição da proteína na cromatografia de troca-iônica ocorre na ausência e também na presença do sal em todas concentrações aplicadas no tampão. No início da cromatografia a 0% de sal a proteína provavelmente eluiu pela saturação da coluna, porém no momento esperado, na presença de 300 mM de NaCl a eluição protéica ocorreu em um grau satisfatório de purificação, mas apresentando ainda proteínas de aproximadamente 40 kDa. Para o mesmo autor a proteína de 40 kDa eluída a 300 mM de NaCl, juntamente com proteína 10,4 kDa, deve ser produto de agregação. Essa hipótese foi esclarecida após a banda 10,4 kDa ter sido recortada do gel de poliacrilamida e reaplicada em gel e os resultados apresentaram reaparecimento da banda de alta massa molecular. Seguindo a mesma metodologia de purificação por cromatografia de troca-iônica estabelecida por Higuchi (2009), observamos que a eluição da leucurogina em maior grau de pureza foi na presença de 300 mM de NaCl, apresentando também o mesmo perfil em eletroforese gel obtido nos estudos feitos por Higuchi (2009).

Nas últimas décadas, tem sido observado na literatura científica, um grande interesse pelo cultivo de células, em particular as de humano. Esta tendência se deve principalmente ao fato do desenvolvimento de novos produtos que proporcionam as células em cultura um ambiente mais favorável ao seu crescimento, seguido de melhores resultados (INGBER, 2005). Matrigel é composta de matriz extracelular proveniente de sarcoma de camundongo, ricos em colágeno do tipo IV, heparan sulfato proteoglicanas e fatores de crescimento que são importantes para o desenvolvimento celular (INGBER, 2006). Células cultivadas em matrigéis experimentam, de fato, um ambiente mais rico (INGBER, 2005). Células endoteliais quando cultivadas em *in vitro* na presença de matrigel, deixam de crescer em monocamada e começam a formar estruturas pró-angiogênicas. A formação dessas estruturas faz parte do crescimento primário de vasos sanguíneos (CLEMETSON, 1998, INGBER, 2006). Além disso, células endoteliais expressam moléculas adesivas incluindo integrinas que influenciam nas suas funções. Algumas integrinas como  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_2\beta_1$  e  $\alpha_1\beta_1$  presentes em células endoteliais atuam como receptoras de colágeno, laminina e fibronectina. Por isso, antagonistas dessas integrinas têm sido desenvolvidos para inativar suas ligações específicas, levando a inibição do crescimento dessas células. No entanto, para o tratamento de doenças como o câncer, esses antagonistas podem promover a ação anti-angiogênica em tumores.

Sendo assim, resolvemos testar a atividade da leucurogina em células endoteliais – HUVEC cultivadas *in vitro* na presença de matrigel.

Em estudos prévios de viabilidade da HUVEC na presença de diferentes concentrações de leucurogina, a concentração de 25 µg/mL induziu redução significativa à viabilidade dessa linhagem endotelial. Já os resultados da angiogênese *in vitro*, mostraram que nesta mesma concentração leucurogina não foi capaz de inibir significativamente a formação das estruturas pró-angiogênicas. Isso pode ser explicado, considerando que em ensaios de viabilidade, as HUVEC cresceram na presença de meio de cultura RPMI acrescido de 10% de SFB. As quantidades de proteínas da MEC e de fatores de crescimento presentes nesse meio de cultura são bem menores quando comparados às condições de cultivos da HUVEC acrescido de matrigel. É possível que nas condições de cultivo celular oferecido nos ensaios de angiogênese a adesão da célula à MEC tenha sido mais elevada e a concentração 25 µg/mL de leucurogina não foi suficiente para antagonizar integrinas específicas receptoras de componentes da MEC. Desta forma, para inibir a formação dos tubos angiogênicos uma dose maior de leucurogina seria necessária, como observado por nós. Na concentração 50 µg/mL, leucurogina inibiu a formação das estruturas pró-angiogênicas na ordem de 66% em comparação ao grupo controle. Na literatura, estão descritas diversas metodologias para estudos da ação de desintegrinas recombinantes sobre o processo angiogênico. Ramos e cols (2007), optou por outro método para avaliar a atividade anti-angiogênica da DisBa-01, uma desintegrina recombinante descrita por antagonizar a integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Nesses estudos a inibição da angiogênese foi caracterizada por ensaios *in vivo* utilizando matrigel plug. A matrigel plug por ser empregada em estudos *in vivo* possui concentrações ainda maiores de proteínas e fatores de crescimento que a matrigel para uso *in vitro*. Para esse ensaio os autores observaram que 100 nM de proteína foi capaz de reduzir significativamente a formação de vasos em matrigel plug. Para os estudos de angiogênese *in vitro* apresentado nesse trabalho, a escolha da metodologia foi baseada no trabalho publicado por Paschoalin (2007), que caracterizou a atividade anti-angiogênica de oligopeptidases.

O processo de adesão celular é mediado por receptores presentes na membrana que interagem com componentes da MEC. Integrinas presentes em células endoteliais atuam como receptores de colágeno, laminina, fibronectina e



trombospondina. As integrinas  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_2\beta_1$  e  $\alpha_1\beta_1$  são conhecidas por estarem envolvidas na angiogênese (CLEMETSON, 1998). Higuchi (2009), ao analisar a competição entre a leucurogina e colágeno do tipo I, e leucurogina e fibronectina na interação com integrinas na adesão celular, evidenciou uma interação da proteína recombinante com integrinas receptoras de colágeno, devido ter ocorrido a inibição da adesão entre célula ao colágeno pela adição da leucurogina, e como este resultado não foi observado para a fibronectina (ligante da  $\alpha_v\beta_3$ ) é possível que a leucurogina seja um ligante de alta afinidade para receptores de colágeno I ( $\alpha_2\beta_1$ ). Para a análise da atividade anti-angiogênica da leucurogina *in vitro*, pode-se avaliar que devido ao fato da matrigel ter altas concentrações de colágeno do tipo IV e a leucurogina ter mostrado capaz de inibir a interação entre as células endoteliais à matrigel, é possível que essa proteína iniba também receptores específicos de colágeno IV (integrina  $\alpha_1\beta_1$ ). Trabalhos com outras desintegrinas recombinantes na presença de colágeno também apresentaram resultados interessantes e significativos. Marcinkiewicz, (2003) trabalhando com obtustatina, uma desintegrina recombinante obtida do veneno da serpente *Vipera lebetina* mostrou que na presença de colágeno tipo IV essa proteína foi um potente inibidor da angiogênese *in vitro*. Cominett e cols (2004), trabalhando com alternagin-C (Alt-C), uma desintegrina-símile isolada do veneno da serpente *B. alternatus*, mostraram que essa proteína se liga fortemente à integrina  $\alpha_2\beta_1$ , o mais importante receptor de colágeno tipo I. Pela capacidade da Alt-C em inibir a adesão de fibroblastos por colágeno do tipo I, os autores propuseram que a integrina  $\alpha_2\beta_1$  seja o receptor específico para o colágeno tipo I.

Pelo fato da leucurogina ter apresentado atividade de inibição da angiogênese *in vitro*, procurou-se investigar também a ação dessa proteína em angiogênese *in vivo* utilizando o modelo de matrizes esponjas. Para tanto, uma lesão promovida pela introdução de implante de esponja no compartimento subcutâneo dos camundongos induziu resposta local similar à observada em processos inflamatórios crônicos e de cicatrização de feridas, onde é observado o desenvolvimento de uma série complexa e organizada de eventos, resultando no acúmulo celular e vascular no local da lesão (MARTIN, 1997). No 16º dia após o implante as esponjas foram retiradas e os níveis de hemoglobina nelas determinados, como indicativo indireto dos níveis de vascularização. A atividade anti-angiogênica significativa da leucurogina ficou evidenciada a partir da ordem de 10  $\mu\text{g}/\text{animal}$ , tanto nos

resultados apresentados pela via de tratamento intraperitoneal (IP), como pela via de aplicação da proteína feita diretamente nas esponjas (ES). Para Rubin's (2008), em ensaio *in vivo*, aproximadamente 90% da droga aplicada para tratamento é secretada ou degradada pelo sistema fisiológico do animal. Resultados interessantes foram obtidos na dosagem de hemoglobina das esponjas retiradas de camundongos tratados pela via intraperitoneal. O conteúdo protéico após ser aplicado no peritônio tende a entrar rapidamente em contato com a corrente sanguínea. As chances de a proteína ser hidrolisada por proteinases presentes no sistema fisiológico são muito maiores quando comparado ao tratamento realizado com injeções de proteína feitas diretamente na esponja. Para essa última, a leucurogina teve ação direta no local do implante. Entretanto, os resultados da dosagem de hemoglobina mostraram que, embora o grupo controle da via ES tenha apresentado significativamente uma quantidade maior de hemoglobina em comparação ao grupo controle IP, o tratamento com 10 µg/animal de leucurogina para ambas as vias apresentaram resultados similares na concentração final de hemoglobina. Neste ensaio, a realização de uma curva dose/efeito foi necessária para identificar a concentração de leucurogina mais eficiente para inibição da angiogênese *in vivo*. Foi verificado nos resultados entre os grupos tratados com 10, 25 e 50 µg/animal de proteína que não houve diferença significativa entre os tratamentos. Indicando que o uso de concentrações elevadas de leucurogina não aumenta seu efeito anti-angiogênico em matrizes esponjas. Santos (2005), ao estudar a ação de uma proteína recombinante homóloga à angiostatina sobre a angiogênese *in vivo*, verificou que a atividade anti-angiogênica dessa proteína pôde ser bem caracterizada utilizando modelos de matrizes esponja. Essas esponjas por não serem compostas de materiais orgânicos não atuam de forma citotóxica no organismo dos camundongos e sua estrutura permanece fixa no local do implante durante todo o período de tratamento, facilitando a formação dos vasos sanguíneos por processo inflamatório.

Angiogênese tumoral é estimulada por uma variedade de fatores de crescimento, entre eles o VEGF, o FGF, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), os fatores de crescimento transformantes  $\alpha$  e  $\beta$  (TGF $\alpha$  e  $\beta$ ) entre outros. Melanócitos transformados são conhecidos por produzirem altas quantidades de bFGF e VEGF. A extensiva produção de fatores de crescimento continua até a formação completa de novos vasos sanguíneos (MAHABELESHWAR, 2007).

Pesquisas recentes mostraram que o VEGF pode induzir a super expressão das integrinas  $\alpha_1\beta_1$  e  $\alpha_2\beta_1$  em diversos tipos de câncer, incluindo melanoma. A expressão de bFGF automaticamente aumenta os níveis de expressão de VEGF e VEGF-R. Quantidades significativas de bFGF são encontradas associadas a MEC com a membrana basal na formação de novos vasos sanguíneos em melanoma (RUBIN'S e STRAYER, 2008). Pelo fato da leucurogina ter apresentado capacidade de inibir a formação de estruturas pró-angiogênicas *in vitro* e angiogênese *in vivo*, foi proposto avaliar se essa proteína possui atividade inibitória sobre proliferação de células endoteliais (HUVEC) e células tumorais de melanoma murino (B16F10) estimulada com fator de crescimento de fibroblasto. Os resultados da proliferação celular em 24h mostraram que os grupos controles de ambas linhagens celulares responderam significativamente ao FGF. Os grupos das duas linhagens que foram estimuladas com fator de crescimento e depois tratadas com concentrações crescentes de leucurogina (10, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentaram resultados significativos a partir de 10  $\mu\text{g/mL}$ . Analisando os resultados foi possível observar que para as duas linhagens celulares a ação da leucurogina apresentou atividades similares. Esse resultado pode ter ocorrido porque a HUVEC mesmo não sendo uma célula tumoral, em cultura, seu fenótipo está alterado, sendo assim, ela pode apresentar características próximas a células tumorais (B16F10), justificando a similaridade dos resultados da ação da leucurogina para as duas linhagens. Outras desintegrinas estão descritas como potentes inibidores de células endoteliais e tumorais estimuladas com FGF. A salmosina, mostrou ser antagonista da integrina  $\alpha_v\beta_3$  em ensaio de crescimento tumoral e angiogênese estimulada por fator de crescimento (KANG e cols, 1999). A desintegrina do veneno da serpente *B. alternatus* descrita como DisBa-01, também inibiu a proliferação celular estimulada por FGF bloqueando a integrina  $\alpha_v\beta_3$  (RAMOS e cols, 2007).

Antagonistas de integrinas podem inibir seus efeitos ligando-se a sua subunidade  $\beta$ . Essa ligação pode propiciar uma mudança de conformação na integrina específica e impedir que ela faça a comunicação com a parte citoplasmática do receptor tirosinaquinase específicos de fatores de crescimento, e dessa forma levar a inibição e/ou ativação de vias de sinalização celular como sobrevivência, apoptose, regulação de actina e citoesqueleto, invasão, migração, proliferação e adesão celular (GULLBERG e cols 2003; MIYAMOTO e cols, 1996; ELICIERI, 2001). Pelo fato da leucurogina ter apresentado atividade de inibição de

agregação plaquetária, adesão celular dependente de colágeno I, atividade de redução do crescimento tumoral *in vivo* (HIGUCHI, 2009), e apresentado nesse estudo ação anti-angiogênica *in vivo* e *in vivo* e inibição da proliferação celular, é provável que essa proteína tenha efeito inibitório por meio de uma dessas vias de sinalização. No entanto, estudos direcionados para evidenciar essa hipótese ainda precisam ser realizados.

Higuchi (2009), descreveu que a leucurogina na dose de 7,5 µg/animal foi capaz de inibir o crescimento tumoral de melanoma em 51%, em ensaio *in vivo* utilizando animais nude imunodeficientes. Para o trabalho aqui apresentado a proteína demonstrou uma redução do crescimento tumoral de Ehrlich de aproximadamente 44% nos camundongos tratados com 10 µg/animal de proteína recombinante. Devido a esses resultados, neste trabalho foi proposto também avaliar a ação da leucurogina na metástase pulmonar tumoral. Em melanoma, após o surgimento do tumor primário, as células transformadas entram rapidamente em mitose. O tumor inicia o processo angiogênico quando atinge o tamanho de aproximadamente 1 a 2 mm<sup>3</sup> (BRONCHUD e cols, 2008). Neste estágio as células tumorais começam a liberar fatores de crescimento que atraem microvasos próximos ao tumor (ALBERTS e cols, 2004). Uma vez que as células tumorais entram na circulação estas precisam se aderir ao endotélio para invadir outros tecidos. Para isto as células tumorais formam complexos com plaquetas e esta associação parece ser essencial para uma metástase bem sucedida (GOULD e cols, 1990; HUANG e cols, 1991). A habilidade das células tumorais de induzir agregação plaquetária está bem difundida entre diversos tipos de cânceres como carcinoma de mama, adenocarcinoma de colo, carcinoma de pulmão e melanomas (SHEU e cols, 1997). A participação das plaquetas nos processos metastáticos parece resultar da ligação direta das plaquetas com as células tumorais e da liberação de agentes indutores solúveis por parte dos tumores. Estes agentes incluem ativadores clássicos de plaqueta como ADP, catepsina B, proteinases tipo trombina e colágeno (ZHOU e cols, 1995). Desta maneira, as plaquetas atuam facilitando todos os passos intermediários da metástase transvascular incluindo a retenção das células tumorais, interação com o sub-endotélio e extravasamento da microvasculatura. O extravasamento é parte do processo de invasão e envolve a adesão de células tumorais na membrana basal, a proteólise parcial de camadas desta membrana seguida da penetração celular através da parte digerida (migração). É interessante

notar que integrinas também participam da regulação da atividade das MMPs, metaloproteinases de matriz que degradam a membrana basal. Resumidamente durante a invasão as integrinas funcionam não só como receptor de adesão e migração, mas também como ativador de fixador de proteinases que são requeridas para a degradação da matriz extracelular. De fato inibidores destas interações inibem a invasão de células tumorais no processo de metástase em modelos de animais (RUBIN'S e STRAYER, 2008). Melanoma, por ser derivado de melanócitos, possui pigmentos. Por isso, são bons modelos para estudo da metástase pulmonar. No ensaio de metástase tumoral apresentado neste trabalho, B16F10 foi injetada na veia caudal de camundongos para ultrapassar algumas fases do crescimento tumoral. Devido à elevada concentração de células injetadas no sistema circulatório dos animais, a progressão da doença ocorreu mais rapidamente. Os resultados mostraram que animais do grupo controle tratados com PBS apresentaram uma quantidade de nódulo pulmonar muitas vezes maior que quando comparado ao número de nódulos presentes nos pulmões dos animais tratados com leucurogina. O resultado da ação da leucurogina na inibição da metástase tumoral não ocorreu por acaso. Higuchi (2009) realizou ensaios de agregação plaquetária e obteve resultados significativos da atividade dessa proteína. O mesmo autor descreveu que a 1,3  $\mu\text{M}$ , leucurogina é capaz de inibir a agregação das plaquetas em ensaios *in vitro* e no presente trabalho a proteína recombinante apresentou ação na inibição da angiogênese. Desta forma, pode ser proposto que a inibição da metástase tumoral apresentada pela ação leucurogina seja uma consequência da atividade inibitória dessa proteína em outros eventos celulares como já descritos. Contudo, a atividade inibitória da leucurogina aumenta as chances de sobrevivência do organismo em tratamento, propondo que os estudos com a leucurogina pode contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer.

Muitos trabalhos vêm sendo publicados mostrando que a interferência na sinalização dependente de integrina pode promover a base para o desenvolvimento de agentes inibidores de angiogênese e metástase tumoral. Kung e cols (1997) publicaram um dos primeiros estudos de inibição da metástase por desintegrinas recombinantes. Em estudos prévios os autores observaram que a salmosina é uma antagonista da agregação plaquetária dependente de integrinas  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  e  $\alpha_5\beta_1$ . Logo em seguida propuseram que na dose de 1,25 mg/kg a proteína atua na redução significativa da metástase tumoral. Outros autores como Ramos e cols

(2007), também investigaram a ação de desintegrinas na progressão tumoral e mostraram que na dose 2 mg/kg de DisBa-01 inibe a metástase tumoral após 14 dias de tratamento com a proteína recombinante. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de expressar a leucurogina em *P. pastoris* e testar sua atividade como antagonista da angiogênese e metástase. Os resultados aqui apresentados mostraram que a produção da leucurogina pode servir como ferramenta capaz de mostrar a interação entre integrinas e componentes da MEC, gerando o desenvolvimento de uma nova terapia contra o câncer.

## VI Conclusões

- Leucurogina foi capaz de inibir a formação de estruturas pró-angiogênicas *in vitro* utilizando matrigel e angiogênese *in vivo* utilizando matrizes esponjas;
- Nas linhagens HUVEC e B16F10 leucurogina apresentou capacidade de inibir a proliferação celular;
- Leucurogina apresentou atividade de inibição do crescimento tumoral de Ehrlich e metástase tumoral de melanoma murino (B16F10).

## VII REFERÊNCIAS

AKAGI, Y.; LIU, W.; XIE, K.; ZEBROWSKI, B.; SHAHEEN, R. M.; ELLIS, L. M. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by interleukin1beta. **J. British. Cancer.** v. 80, p.1506-1511, 1999.

ALBELDA, S. M.; BUCK, C. A. Integrins and other cell adhesion molecules. **J. Faseb.** v. 4, n. 11, p. 2868-80, 1990.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTES, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula.** Tradução por ana Beatriz Gorini da Veiga e cols. 4 ed. Porto Alegre: Arteme, 2004.

ARTONI, L. P.; MOURA, C. E.B.; BARBOSA JR., E. M.; CAMPOS, D. B.; PEREIRA, F. T.V.; PAPRA, P.C. Fator de crescimento fibroblástico básico e seus receptores em relação à atividade proliferativa na placenta bubalina em diferentes fases da gestação. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootecnia.** v. 59, n.3, P. 605-613, 2007.

ATKINSON, R. A.; SAUDEK, V.; PELTON, J. T. Echistation: redefined structure of a disintegrin in solution by 1H NMR and restrained molecular dynamics. **Int. J. of Pept. Protein Res.** v. 43, n. 6, p. 563-572, 1994.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N.D.; WOESNER, J.F. **Hand. Prot. Enzymes**, 2 ed. v. 1, Elsevier, 2004.

BERNARDINI, G.; RIBATTI, D.; SPINETTI, G.; MORBIDELLI, L.; ZICHE, M.; SANTONI, A.; CAPOGROSSI, M.C. & NAPOLITANO, M. Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. **J. Methods Immunol.** v. 273. n. 1-2, p. 83-101, 2003.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Snake venom metalloendopeptidases: reprotolysins. **Methods enzymol.** v. 68, p. 248-345, 1995.

BORISH, I. C. & STEINKE, J. W. Cytokines and chemokines. **J. Aller. Clinic Immunology.** v. 11, p. S460-S475, 2003.

BORRIRUKWANIT, K. L. M. A.; MERCURI, F. A.; BLICK, T.; PRICE, J. T.; FRIDMAN, R.; PEREIRA, J. J.; LEARDKAMONKARN, V.; THOMPSON, E. W. The tupe I collagen induction of MT1-MMP-mediated MMP-2 activation is repressed by alphaBbeta3 integrin in human breast cancer cells. **Matrix Biology.** v. 26 n. 4p. 291-305, 2007.



- BOUDREAU, N.; BISSELL, M. J. Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.10, n. 5, p. 640-6, 1998.
- 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. 248-254, 1976.
- BRASILEIRO FILHO, G.; GUIMARÃES, R. C.; BOGLIOLO, L. **Distúrbios de crescimento e da diferenciação celular**. In: BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo – Patologia. 6ed, Guanabara Koogan, 2000.
- BRONCHUD, H. M.; FOOTE, M.; GIACCONE, G.; OLOPADE, O.; WORKMAN, P. **Principles of molecular oncology** 2ed. Humana Press, 2008.
- CALVETE, J. J; JURGENS, M.; MARCINKIEWICZ, C.; ROMERO, A.; SCHRADER, M.; NEIWIAROSKI, S. Disulphide-bond pattern and molecular modelling of the dimeric disintegrin EMF-10, a potent and selective integrin alpha5beta1 antagonist from *Eristocophis macmahoni* venom. **J. Biochem**. v. 3 n 345, p. 573-81, 2000.
- CALVETE, J. J; JUÁREZ, P. SANA, L. Snake venemics. Strategy and applications. **J. Mass. Spectrom**, v. 42, n. 11, p. 1405-14, 2007.
- CALVETE, J. J.; MCLANE, M. A.; STEWART, G. J.; NIEWIAROWSKI, S. Characterization of the crosslinking site of disintegrin albolabrin, bitistatin, echistatin, and eritostatin on isolated human platelet integrin GPIIb/IIIa. **Biochem. Biophys Res. Commun**. v. 1, n. 202, p. 40-135, 1994.
- CARLOS, T. M.; HARLAN, J. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**, v. 84 p.2068-2101, 1994.
- CARMELIET, P.; MOONS, L.; COLLEN, D. Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis. **Res. Cardiovasc**. v. 39, n. 1, p.8-33, 1988.
- CHAN, B. M.; MATSUURA, N.; TAKATA, Y.; ZETTER, B. R.; HEMLER, M. E. *In vitro* and *in vivo* consequences of VLA-2 expression on rhabdomyosarcoma cells. **Sceinse**, v. 29, n. 251, p. 1600-2, 1991

CHAVAKIS, E.; DIMMELER, S. Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. **Art. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 22, p. 887-893, 2002.

CLARK, E. A.; BRUGGE, J.S. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. **Science**. v. 268, p. 233-239, 1995.

CLEMETSON, K.J. Integrins, dynamic cell receptors. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 54, p. 499-501, 1998.

COMINETI, M.R.; Metaloproteases/desintegrinas isoladas do veneno da serpente *Bothrops alternatus* sobre a adesão celular e expressão gênica. Universidade Federal de São Carlos. 199 p. **Tese** (Doutorado em Ciências Fisiológicas), 2004.

COMINETI, M. R.; TERRUGGI, C. H.; RAMOS, O. H.; FOX, J. W.; MARIANO-OLIBEIRA, A.; DE FREITAS, M. S.; FIGUEIREDO, C. C.; MORANDI, V.; SELISTRE-DE-ARAUJO, 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. 18247-55, 2004.

COOPER, G. M. **A célula: uma abordagem molecular**. 2ª ed, Artemed, 2001.

D'AMORE, P.A; THOMPSON, R.W. Mechanisms of angiogenesis. **Annu Rev. Physiol**, v. 49, p. 453-464, 1987.

DANEM, E. M.; MARCINKIEWICZ, C.; COMELISSEN, I. M.; VAN, K. A. A.; PACHTER, J. A.; RUITER, D. J.; NIEWIAROWSKI, S. VAN, M. G. N. Disintegrin eritostatin interferes with integrin  $\alpha 4 \beta 1$  function and with experimental metastasis of human melanoma cell. **Exp. Cell. Res.** v. 10 n. 238, p. 188-96, 1998.

DERYUGINA, E. I.; QUIGLEY, J. P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 25, n. 1, p. 9-34, 2006.

DRABKIN, D. L.; AUSTIN, J. H. Spectrophotometric constants common hemoglobin derivatives in human, dog and rabbit blood, **J. Biol. Chem.** v. 98, p. 719-733, 1932.

DUPERRAY, A. TROESCH, A.; BERTHIER, R.; CHAGNON, E, FRACHET, P, USAN, G. MARGUERIE, G. Biosynthesis and assembly of platelet GPIIb and GPIIIa

is a prerequisite for expression of the complex on cell surface. **Blood**. V. 1. n. 101, p. 47-56. 1989.

ELICEIRI, B. P. Integrin and growth factor receptor crosstalk. **Circulation Research**, v. 89. p. 1104-1110, 2001.

ENHOLM, B.; PAAVONEN, K.; RISTIMAKI, A.; KUMAR, V.; GUNJII, Y.; KLEFSTROM, J.; KIVINEN, L.; LAIHO, M.; OLOFSSON, B. JOUKOV, V.; ERIKSSON, U.; ALITALO, K. Comparison of VEGF, VEGF B, VEGF C and Ang1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. **Oncogene** 14, 2475-2483,1997.

FELDMAN, M.; BRENNAN, F. M.; MAINI, R. N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. **Annu. Rev. Immunol**, v. 14, p.397-440, 1996.

FERRARA, N.; CHEN, H.; DAVIS SMYTH, T.; GERBER, H.P.; NGYEN, T. N.; PEERS, D.; CHISHOLM, V.; HILLAN, K. J.; SCHWALL, R. H. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. **Nat. Med.**, v. 4, p. 336-340, 1998.

FOLKMAN, J.; LONG, D. M.; BECKER, F. F. Growth and metastasis of tumor in organ culture. **Cancer**, v.16, p. 453-67, 1963.

FOLKMAN J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. **Ann. Surg**. v.175, p. 409-416, 1972.

FOLKMAN, J.; BREM, H. **Angiogenesis and inflammation. In: Inflammation basic principles and clinical correlates**, 2ed, New York: Raven Press,1992.

FOLKMAN J, WATSON K, INGBER D, HANAHAN D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neuplasia. **Nature**. v. 339, p. 58-61, 1989.

FOLKMAN J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston: Clinical Applications of Research on angiogenesis. **N. Engl. J. Med.** 333: 1157-1763, 1995.

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

GLADSON, C. L.; Expression of integrina alpha v beta 3 in small blood vessels of glioblastoma tumors. **J. Neuropathol Exp. Neurol.** v. 11, n. 55, p. 1143-9, 1996.

GOULD, R. J.; POLOKOFF, M. A.; FRIDMAN, P. A.; HUANG, T. F.; HOLT, J. C.; COOK, J. J. NIEWRAROEOWSKI, S. disintegrin: a family of integrina inhibitory proteins from viper venoms. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 2, n. 195, p. 168-71, 1990.

GUI, G. P.; PUDDEFOOT, J. R.; VINSON, G. P.; WELLS, C. A.; CARPENTER, R. In vitro regulation of human breast cancer cell adhesion and invasion via integrina receptors to the extracellular matrix. **J. Br. Surg.** v. 9, n. 82, p. 1192-6, 1995.

GULLBERG, D. **I Domin in integrins molecular biology**, Landes Broscience, 2003.

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

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

HANAHAN, D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. **Science** v. 277, p. 48-50,1997.

HANDSLEY, M. M.; EDWARDS, D. R. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. **Int. J. Cancer**, v. 115, p. 849-860, 2005.

HATI, R.; MITRA, P.; SARKER, S.; BHATTACHARYYA, K.K. Snake venom hemorrhagins. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 29, p.19, 1999.

HEINO, J. Integrin-type extracellular matrix receptors in câncer and inflammation. **Ann Med.** v. 4, n. 25, p. 335-42, 1993.

HIGUCHI, D. A. **Purificação e caracterização biológica parcial de uma desintegrina-símile recombinante produzida a partir de clone isolado da glândula salivar de *Bothrops leucurus***. Tese de doutorado em Biotecnologia. UMC, Mogi das Cruzes, 2009.

HINSBERGH, W.M.; KOOLWIJK, P.; Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. **Cardiovascular Res.** v. 78, p. 203-212, 2008.

HITE, L. A.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Sequence of a cDNA clone encoding the zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin e from *Crotalus atrox*: evidence for signal, zymogen, and disintegrin-like structure. **Biochemistry.** v. 27, n. 31, p. 6203-11, 1992.

HOEBEN, A.; LANDUYT, B.; HIGHLEY, M.S.; WILDIERS, H.; VAN OOSTEROM, A.T.; DE BRUIJN, E.A. Vascular Endothelial growth factor and angiogenesis. **Pharmacol. Rev.**, v. 56, n. 4, p. 549-80, 2004.

HUANG, T. F.; WANG, W. J.; TENG, HEINO C. M.; OUYANG, C. Mechanism of action of the antiplatelet peptide, arietin, from *Bitis arietans* venom. **Acta Biochim Biophys.** v. 1, n. 1074, p. 144-50, 1991.

HYNES, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion matrices. **Thromb Haemost.** v. 1. n. 69, p. 11-25, 1992.

INGBER D. E. Mechanical controls of tissue growth: Function follows form. **PNAS** 102: 11571-72, 2005.

INGBER, D. E. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. **J. Faseb**, v. 20, p. 811-27, 2006.

JAIN, R. K. Molecular regulation of vessel maturation. **Nat. Med**, v. 9, p. 685-693, 2003.

JULIANO, R. L. The role of beta 1 integrins in tumors. **Semin. Cancer Biol.** v. 5, p. 277-83, 1993.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of  $\alpha_2\beta_1$ -integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **J. Biochem.** v. 2 n. 320, p. 635-41, 1996.

KAMIGUTI, A. S.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; LAING, G. D.; KNAPP, T.; ZUZEL, M.; FOX, J. W. Theakston RD. Collagen-induced secretion-dependent phase of platelet aggregation is inhibited by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **Acta Biochim Biophys.** v. 1-2, n. 1335, p. 209-7, 1997.

KERN, A.; BRIESEWITZ, R.; BANK, I.; MARCANTONIO, E.E. The role of the I domain in ligand binding of the human integrin  $\alpha_1\beta_1$ . **The Journal of Biological Chemistry.** V. 269, n. 36, p. 22811-22816, 1994.

KUMAR, V.; COTRAN, R.S.; SCHOEN, F.J. Robbins – **Patologia Estrutural e funcional.** 7ed, Elsevier, 2005.

LIEKENS, S.; DE CLERCQ, E.; NEYTS, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. **Biochem. Pharmacol.**, v. 61, n. 3, p. 253-270, 2001.

LUI, Z.; BRATTAIN, M. G.; APPERT, H. Differential display of reticulocalbin in the highly invasive cell line, MDA-MB-435, versus the poorly invasive cell line, MCF-7. **Res. Biochem. Biophys Commun.** v. 2, n. 23, p. 283-9, 1997.

MAESHIMA, Y.; COLORADO, P.C.; TORRE, A.; HOLTHAUS, K.A.; GRUNKEMEYER, J.A.; ERICKSEN, M.B. HOPFER, H.; XIAO, Y.; STILLMAN, I.E.; KALLURI, R. Distinct antitumor Properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. **J. Biol. Chem.** v. 275, n. 28, p. 21340-8 2000.

MAHABELESWAR. G. H.; BYZOVA, T. V. Angiogenesis in Melanoma. **Seminars in Oncology.** V. 34, n.6, 555-565, 2007.

MARCINKIEWICZ, C.; WEINREB, P.H.; CALVETE, J. J.; KISIEL, D. G.; MOUSA, S. A.; TUSZYNSKI, G. P.; LOBB, R. R. N. Obtustatin: A potent selective inhibitor of  $\alpha_1\beta_1$  integrin *in vitro* and angiogenesis *in vivo*. **Cancer Res.** v. 63, p. 2020-2023, 2003.

MARTIN, P. Wound healing - aiming for perfect skin regeneration. **Science**. v. 276 p.75-81, 1997.

MARUYARNA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; SHIMAYA, K.; MIHARA, H. Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzyme: possible role in haemorrhage. **Toxicon**. v. 11, p. 1387-97, 1992.

MACKAY, D. G.; MOROZ, C.; DE VRIES, A.; CSAVOSSY, I.; CRUSE, V. The action of hemorrhagin and phospholipase derived from *Vipera palestinae* venoms on the microcirculation. **Lab. Invest**. v. 5, n. 22, p. 387-99, 1970.

MCLANE, M. A.; MARCINKIEWICZ, C.; VIJAY-KUMAR, S.; WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I.; NIEWIAROWSKI, S. Viper venom disintegrins and related molecules. **Proc. Soc. Exp. Biol Med**. v. 2, n. 219, p. 109-19, 1998.

MCLANE, M. A.; SANCHEZ, E. E.; WONG, A.; PAQUETTE-STRAUB, C.; PEREZ, J. C. Disintegrins. **Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.**, v. 4, n. 4, p. 327-55, 2004.

MIYAMOTO, S.; TERAMOTO, H.; GUTKIND, J.S.; YAMADA, M. K. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP Kinase activation: Roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. **J. of Cell. Biology**, v. 135, n. 6 p. 1633-1642, 1996.

MINEA, R.; SWENSON, S.; COSTA, F.; CHEN, T. C.; MARKLAND, F. S. Development of a novel recombinant disintegrin, contortrostatin, as an effective anti-tumor and anti-angiogenic agent. **Pathophysiol. Haemost. Thromb**. v. 34, n. 4-5, p. 177-83, 2005.

MIZEJEWSKI, G. J. Role of integrin in cancer: survey of expression patterns. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med**. v. 2, n. 222, p. 124-38, 1999.

MOISEEVA, N.; BAU, R.; SWENSON, S. D.; MARKLAND, F. S.; CHOE, J. Y.; LIU, Z. J.; ALLAIRE, M. Structure of acostatin, a dimeric disintegrin from Southern copperhead (*Agkistrodon contortrix contortrix*), at 1.7 Å resolution. **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.**, v. 64, p. 466-70, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Imm. Meth.**, v. 65, p 55-63, 1983.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; MARCINKIEWICZ, C.; MARCINKIEWICZ, M.; NIEWIAROWSKI, S. Selective recognition of alpha2beta1 integrin by jararhagin, a Metalloproteinase/disintegrin from Bothrops jararaca venom. **Thromb. Res.**, v. 102, n. 2, p.153-9, 2001.

MÜLLER, B. Cytokine imbalance in non immunological disease. **Cytokine**. v.18, 334-339, 2002.

NIEWIAROWSKI, S.; MCLANE, M. A.; KLOCZEWIAK, M.; STEWART, G. J. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Semin. Hematol.**, v. 31, n. 4, p. 289-300, 1994.

O'REILLY, M.S.; BOEHM, T.; SHING, Y.; FUKAI, N.; VASIOS, G.; LANE, W.S.; FLYNN, E.; BIRKHEAD, J.R.; OLSEN, B.R. & FOLKMAN, J. Endostatin: an endogenous inhibitor of Angiogenesis and tumor growth. **Cell**, v.88, n. 2, p. 277 – 85, 1997.

OWNBY, C. L. BJARNASON, J. TU, A. T. Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by there purified toxins. **J. Am. Pathol.** v. 1, n. 93, p. 201-18, 1978.

PASCHOALIN, T.; CARMONA, K. A.; RODRIGUES, E. G.; OLIVEIRA, V.; MONTEIRO, H.P.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; TRAVASSOS, L.R. Characterization of thimet oligopeptidase and neurolysin activities in B16F10-Next2 tumor cells and their involvement in angiogenesis and tumor growth. **Molecular Cancer**, v. 6, n. 44, 2007.

PHILIPS, D. R.; CHARO, I. F.; PARISE, L. V.; FITZGERALD, L. A. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. **Blood**. v. 4, n. 71, 831-43, 1988.

PLANTEFABER, L. C.; HYNES, R. O. Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. **Cell**., v. 2, n. 56, p. 281-90, 1989.



PLOW, E. F.; D'SOUZA, S.E.; GINSBERG, M. H. Ligand binding to GPIIb-IIIa: a damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. **Exp. Mol. Pathol.** v. 3, n. 18, p. 324-32, 1992.

RADINSKY, R.; FIDLER, I. J. Regulation of tumor cell growth at organ-specific metastases. **In Vivo**, v. 6, p. 1028-1036, 2003.

RAJOTTE, D.; ARAP, W.; HAGEDORN, M.; KOIVUNEN, E.; PASQUALAINI, R.; RUOSLAHTI, E. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display. **J. Clin. Invest.**, v.102, p.430-437,1998.

RAMOS, O. H. P.; KAUSKOT, A.; COMINETTI, M. R.; BECHYNE, I. PONTES, C. L. S.; CHAREYRE, F.; MANENT, J.; VASSY, R.; GIOVANNINI, M.; LEGRAND, C.; ARAUJO, H. S. S.; CRÉPIN, M.; BONNEFOY, A. A novel  $\alpha_v\beta_3$ -blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01 inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 25, p. 53-64, 2007.

RIBEIRO, J. U. Obtenção de um desintegrina recombinante de *Agkistrodon contortrix laticinctus* e estudo do efeito de desintegrinas na expressão do fator de crescimento do endotélio vascular. Universidade Federal de São Carlos. 100 p. **Dissertação** (Mestrado em Genética e Evolução), 2005.

RISAU, W.; FLAMME, I. Vasculogenesis. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v.11, p. 73-91, 1995.

RUBIN'S, R.; STRAYER, S. D. **Rubin's pathology clinicopathologic: Foundations of medicine**, 5 ed., Wolters Kluwer, 2008.

RUDOLPH, R. CHERESH, D. Cell adhesion mechanisms and their potential impactn wound healing and tumor control. **Clin. Plast. Surg.** v. 3, n. 17, p. 457-62, 1990.

RUOSLAHTI, E. The Walter Herbert Lecture. Control of cell motility and tumour in invasion by extracellular matrix interaction. **J. Br. Cancer.** v. 2, n. 66, p. 239-42, 1992.

SANTORO, S. A.; ZUTTER, M.M. The alpha 2 beta 1 integrin: a collagen receptor on platelets and other cells. **Thromb. Haemost.**, v. 74, p. 813-831, 1995.

SANTOS, C. I. **Produção e caracterização de uma proteína recombinante correspondente a fragmento do plasminogênio de humano.** Tese de doutorado pela Universidade Federal de Minas Gerais, MG, 2005.

SHEU, J. B.; KO, W. C.; HUNG, W. C.; PENG, H. C.; HUANG, T. F.; Interaction of thrombin-activated platelets with extracellular matrices (fibronectina and vitronectin): comparison of the activity of Arg-Gly-Asp-containing venom peptides and monoclonal antibodies against glycoprotein IIb/IIIa complex. **J. Pharm Pharmacol.** v. 1, n. 49, p. 78-84, 1997.

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. 256-63, 1994.

SHIRAKAWA, K.; KOBAYASHI, H.; HEIKE, Y. Hemodynamics in vasculogenic mimicry and angiogenesis of inflammatory breast cancer xenograft. **Cancer Res.** v. 62, p. 560-566, 2002.

STEFANINI, O. M.; WU, T. F.; GABHANN, M. F.; POPEL, S. A.; A compartment model of VEGF distribution in blood, healthy and diseased tissues. **BMC systems biology**, v 2, n. 77, 2008.

TAKEYA, H.; ODA, K.; MIYATA, T.; ORNORI-SATOH, T.; IWANAGA, S. The complete amino acid sequence of the high molecular mass hemorrhagic protein HR 1B isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. **J. Biol Chem.** v. 27, n. 265, p. 16068-73, 1990.

THALES, L. **Répteis do Rio Grande do Sul Atuais e Fósseis Biogeografia Ofidismo.** 1ª Ed, Edipucrs, 2002.

TRIKHA, M.; RASO, E.; CAI, Y.; FAZAKAS, Z.; PAKU, S.; POTER, A. T.; TIMAR, J.; HONN, K. V. Role of alpha (b) beta3 integrin in prostate cancer metastasis. **Prostate.** v. 3 n. 35, p. 185-92, 1998.

TRYGGVASON, K. The laminin family. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 5, n. 5, p. 877-82, 1993.

USAMI, Y.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; SHIMA, H.; YASHIOKA, A.; HIRANO, SUZUKI, M.; TITANI, K. A 28 kDa-protein with disintegrin-like structure (jararhagin-C) purified from *Bothrops jararaca* venom inhibits collagen – and ADP-induced platelet aggregation. **Biochem Biophys Res Commun.** v 1, n. 201, p. 331-9, 1994.

VEIKKOLA, T.; ALITALO, K. VEGFs receptors and angiogenesis. **Semin. Canc. Biol.**, v. 9, p. 211-220, 1999.

VISSE R.; NAGASE, H.; Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. **Rev. Circ.** v. 92, p. 827-839, 2003.

YAN, W.; BENTLEY, B.; SHAO, R.; Distinct angiogenic mediators are required for basic fibroblast growth factor-and vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis: The role of cytoplasmic tyrosine kinase cAbl in tumor angiogenesis. **Mol. biology of cell**, v. 19, p. 2278-2288, 2007.

YOON, S. O.; PARK, S. J.; YUN, C. H.; CHUNG, A. S. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v. 36, n. 1, p.128-37, 2003.

ZHOU, Q.; SMITH, J. B.; GROSSMAN, M. H.; Molecular cloning and epression of catrocollastatin, a snake-venom protein from *Crotalus atrox* (westen diamondback rattlesnake) which inhibits platelet adhesion to collagen. **J. Biochem.** v. 2, n. 307, p. 411-7, 1995.

**ANEXO A** – Parecer do Comitê de Ética em Manipulação e experimentação animal (CEUA/UMC)



**Título:** “MECANISMO DE AÇÃO DE LEUCUROGINA, UMA PROTEÍNA RECOMBINANTE PRODUZIDA UTILIZANDO CLONE OBTIDO DE *BOTHROPS LEUCURUS*”

**Protocolo:** 017/2009

**Natureza do Pedido:** Pesquisa

**Departamento:** NCA – Núcleo de Ciências Ambientais

**Pesquisador Responsável:** Prof. Dr. Jorge Luiz Pesquero

**Autora:** Meire Coelho de Almeida

#### Resumo

O projeto proposto tem como objetivo geral expressar, purificar e caracterizar parcialmente a atividade anti-angiogênica de desintegrina recombinante do veneno da serpente *Bothrops leucurus*.

#### Parecer

A seleção, alojamento e manipulação estão adequados aos princípios bioéticos na utilização de animais em experimentação. O número de animais não foi definido, mas segue um tratamento estatístico adequado.

#### Conclusão

Projeto aprovado.

Mogi das Cruzes, 26 de Outubro de 2009.

**Profª. Maria Santina de Castro Morini**  
**Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA**  
**Universidade de Mogi das Cruzes - UMC**

**Anexo B** - Protocolo de preparo de soluções

## Protocolo de Soluções

Tampões para cromatografia de troca iônica

Tampão A – Tris HCl 20 mM pH 8,4

2,42 g de Tris

Adicionar 900 mL de água, ajustar o pH para 8,4 com adição HCl. Ajustar o volume para 1L

Tampão B – Tris HCl mM pH 8,4 contendo cloreto de sódio 1M.

2,42g de Tris

58,44g de NaCl

Adicionar 900mL de água, ajustar o pH para 8,4 com adição de HCl. Ajustar o volume para 1L

## Soluções para SDS-PAGE e modo de preparo do gel

Tampão de amostra

2,4mL de tampão Tris HCl 1M pH 6,8

0,8g de SDS

4mL de glicerol 100%

500 $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol

50 $\mu$ L de azul de bromofenol 0,1% (p/v)

Completar o volume para 10mL

Solução de acrilamida-bisacrilamida 30 %

Acrilamida – 29,20g

Bis-acrilamida 0,8g

Completar para 100mL de solução

Filtrar e colocar em frasco escuro a 4°C

Tampão do gel de separação

Tris HCl 2M (pH 8.8)/SDS

24,22g de tris

0,4g de SDS

Completar o volume para 100mL

Persulfato de amônio (PSA) 10%

0,5g de persulfato de amônio em 5mL de água deionizada

Tampão de corrida 10x

30g Tris

144g glicina

10g SDS

Completar o volume final de 1L

Gel de poli(acrilamida) 12,5%

2,7 mL de água deionizada  
 2,0 de tampão de separação  
 3,3 da solução de acrilamida/bisacrilamida  
 100  $\mu$ L de PSA  
 8,5  $\mu$ L de Temed  
 Dearear antes de adicionar p Temed

Gel de empacotamento 5%  
 2,0mL de água Milliq  
 833 $\mu$ L de tampão de empacotamento  
 417 $\mu$ L de solução de acrilamida/bisacrilamida  
 50 $\mu$ L de PSA  
 10 $\mu$ L de Temed

### Outras soluções

Salina 0,9%

9g de NaCl dissolvido em 1L de água Milliq

Salina fosfato tamponada PBS 10X

Solução A:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,5M

Solução B:  $\text{NaHOPO}_4$  0,5M

Em um béquer contendo 90g de NaCl e a solução B, adicionar a solução A até que o pH atinja 7,4. Filtrar

### BMGY

Extrato de levedura 1%

Peptona 2%

Fosfato de potássio 100 mM

Yeast nitrogen base 1,34%

Biotina  $4 \times 10^{-5}\%$  e glicerol 1%

### Meios Básico

$\text{H}_3\text{PO}_4$	26mL
$\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,93g
$\text{K}_2\text{SO}_4$	18,2g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14,9g
KOH	4,13g
Glicerol	4mL
Água	qsp 1L



## PTM1

---

Sulfato cúprico – 5H <sub>2</sub> O	6g
Iodeto de sódio	0,08g
Sulfato de manganês-H <sub>2</sub> O	3g
Molibdato de sódio 2 H <sub>2</sub> O	0,2g
Ácido bórico	0,02g
Cloreto de cobalto	0,5g
Cloreto de zinco	20,0g
Sulfato ferroso 7.H <sub>2</sub> O	65g
Biotina	0,2g
Ácido sulfúrico	5mL
Água	qsp 1L

---

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)