



**COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA NUCLEAR**

**“Aplicação biotecnológica da proteína Leuc-B isolada da
peçonha de *Bothrops leucurus* como protótipo de
radiofármaco antitumoral”**

Lucilene Marcia Gabriel

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Mestre em Ciência e
Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais
2010

**Belo Horizonte
Fevereiro, 2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR

CENTRO DE DESENVOLVIMENTO DA

TECNOLOGIA NUCLEAR

Aplicação biotecnológica da proteína Leuc-B isolada da peçonha de
***Bothrops leucurus* como protótipo de radiofármaco antitumoral**

Lucilene Marcia Gabriel

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre.

Área de concentração: Ciência e Tecnologia das Radiações: Técnicas Nucleares Aplicadas à Saúde e a Biologia.

Orientadora: Dra. Raquel Gouvêa dos Santos

Co-orientador: Dr. Eladio Flores Sanchez

Belo Horizonte
Fevereiro, 2010

A presente dissertação de mestrado, intitulada “**Aplicação biotecnológica da proteína Leuc-B isolada da peçonha de *Bothrops leucurus* como protótipo de radiofármaco antitumoral**”, de autoria de **Lucilene Márcia Gabriel**, foi defendida e aprovada em 22 de fevereiro de 2010, pela Banca Examinadora abaixo assinada.

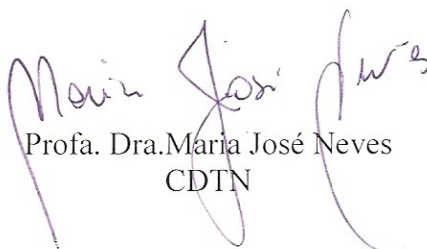
Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2010.



Profa. Dra. Raquel Gouvêa dos Santos
CDTN - Orientadora



Profa. Dra. Ana Maria Moura da Silva
Instituto Butantã



Profa. Dra. Maria José Neves
CDTN

DEDICO ESTE TRABALHO...

**Ao meu marido, pelo amor, paciência e incentivo,
tão necessários nos momentos difíceis.**

**Aos meus pais, pelo carinho e dedicação e por
estarem sempre comigo me incentivando a lutar
pelos meus sonhos.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente na minha vida e tornar tudo possível.

A minha orientadora, Dra. Raquel Gouvêa dos Santos, por sua dedicação, paciência, sensibilidade e apoio ao longo desta jornada.

Ao meu co-orientador, Dr. Eladio Flores Sanchez, pela confiança e ensinamentos que auxiliaram não somente na conclusão deste trabalho, mas também me proporcionaram experiências únicas.

Ao meu marido, por todo apoio e confiança em mim depositados, o que tornou possível a realização deste projeto.

Aos meus pais, pela educação base para minha vida e apoio nos meus estudos e por me incentivar a encarar todos os desafios da vida com coragem e honestidade.

Aos meus irmãos, pelo carinho e apoio em todos os momentos.

Aos professores da pós-graduação, pela contribuição na minha formação profissional e pelos grandes ensinamentos.

Ao professor de espanhol, Edgar, pelos ensinamentos.

A Siléa, pela grande ajuda e cooperação na purificação da Leuc-B.

Aos amigos da FUNED, Gustavo, Gilson, Francisco, Cynthia, Márcia, Regina, Sara, Mike e Alcides, que sempre me apoiaram e ajudaram nesta jornada.

A Marina, pela ajuda e orientação durante os experimentos.

A Marcella, pelos ensinamentos e treinamento necessários à realização deste trabalho.

Ao Paulo, pela ajuda e paciência nos experimentos de aquisição de imagens SPECT.

Aos meus grandes amigos, Lidiane, Lis, Isabella (Dunga), Cristiane, Débora, Rafaella, Ronalli e Vanderlei, que sempre me incentivaram e estiveram presentes nos momentos felizes e conturbados.

Aos amigos, Josiane, Juliano, Isabela e Marcus, pelo carinho, amizade e incentivo durante toda essa jornada.

Aos amigos do Laboratório de Radiobiologia, Luciana, Dani, Fred, Isabela, Bárbara, Luiza, Pryscila Rodrigues, Thaíssa, Marcella, Marina, Paulo, Fabrício, Vitor, Raquel Pereira, Estefânia, Rodrigo, Camila, Márcia e Nino, os quais nos meus incansáveis dias de trabalho estiveram presentes.

A Equipe do reator, Fausto, Paulinho, Rocha, Amaral e José Augusto, pela ajuda e orientação durante a manipulação dos radioisótopos.

Ao Dr. Carlos Malamute, pelo apoio, incentivo e direcionamento nas horas difíceis.

Ao Dr. Carlos Simal e ao Raphael Ligório, pelo fornecimento das doses de ^{131}I , para a realização das imagens.

Ao Prof^o Geovanni e sua aluna Cristina, pelo fornecimento das células de Ehrlich.

Aos amigos da pós-graduação da turma de 2008, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Agradeço especialmente ao Marcos e ao Henrique, pela ajuda durante as aulas de Física das Radiações.

A Equipe da Radioproteção, pelas instruções.

Ao Pessoal do transporte, almoxarifado e gráfica, pela colaboração e serviços prestados.

A Lenira, Virgínia e Nívea, pelo apoio e ajuda na biblioteca.

A Equipe da Pós-graduação, Roseli, Cerisa, Fulgêncio e ao professor Rubens, pelos auxílios fundamentais nas questões e acadêmicas.

A FUNED, pelas instalações e fornecimento do veneno de *Bothrops leucurus*.

A CNEN, pelo financiamento da bolsa de estudos

Ao CDTN, pelas instalações e pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada!!!

"As coisas mais maravilhosas que podemos experimentar são as misteriosas. Elas são a origem de toda verdadeira arte e ciência. Aquele para quem essa sensação é um estranho, aquele que não mais consegue parar para admirar e extasiar-se em veneração, é como se estivesse morto: seus olhos estão fechados".

Albert Einstein

Aplicação biotecnológica da proteína Leuc-B isolada da peçonha de *Bothrops leucurus* como protótipo de radiofármaco antitumoral

Lucilene Marcia Gabriel

Resumo

De acordo com o relatório da Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer, o crescimento desta doença implicará na morte de 17 milhões de pessoas ao ano até 2030. Embora o conhecimento sobre o câncer esteja aumentando consideravelmente, poucos avanços no diagnóstico e terapia de alguns tipos de tumores foram alcançados. Diante desse cenário, é evidente a necessidade de novas substâncias mais específicas, com baixa toxicidade para o paciente, que possam ser usadas para o diagnóstico e tratamento do câncer. A superexpressão de receptores de membrana nas células tumorais são alvos promissores para o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico e terapia contra as neoplasias malignas.

As integrinas são uma família de receptores heterodiméricos de adesão da superfície celular capazes de reconhecer e se ligarem a proteínas da matriz extracelular (MEC). Esse reconhecimento deve-se principalmente ao motivo RGD presente tanto na superfície celular como nas proteínas da MEC. Várias integrinas foram identificadas como reguladoras da progressão de tumores. O motivo RGD também é encontrado em alguns componentes dos venenos de serpente, as chamadas desintegrinas. Estas são capazes de inibir a interação célula-matriz e célula-célula mediada por integrinas e tem sido demonstrado que estas proteínas são capazes de inibir a metástase em processos dependentes de integrinas. As desintegrinas-*like* (ECD), bem como as desintegrinas-RGD também são capazes de se ligarem as integrinas da superfície celular e inibirem a sua adesão aos ligantes naturais. Neste trabalho foi purificada, da peçonha de *Bothrops leucurus* (PBL), uma metaloproteinase de classe P-III com domínio desintegrina-*like* (ECD), a Leucurolisina B (Leuc-B). Esta metaloprotease e a peçonha bruta foram então avaliadas quanto a sua aplicabilidade na detecção diferencial de tumores. Os resultados *in vitro* demonstraram que tanto PBL quanto Leuc-B possuem potente efeito antitumoral sobre várias linhagens de células tumorais: U87, T98, RT2 (glioblastoma), MCF7 (mama), Ehrlich e UACC (melanoma) com valores de IC₅₀ da ordem de 0,6 µM. As alterações morfológicas observadas nestas linhagens quando tratadas com Leuc-B, e os dados da coloração com DAPI e solução de acridina/brometo de etídio, sugerem que o efeito antitumoral destas substâncias ocorre via apoptose. Sondas radioativas de Leuc-B (¹³¹/¹²⁵I- Leuc-B) foram sintetizadas com alta atividade específica e alta pureza radioquímica. Os estudos de biodistribuição, realizados por injeções via endovenosa caudal e intratumoral, em camundongos implantados com tumor de Ehrlich mostraram que a Leuc-B é captada significativamente pelo tumor, (p<0,05). Estes resultados mostram o potencial da Leuc-B como molde para o desenvolvimento de fármacos e radiofármacos para terapia e diagnóstico de tumores.

Biotechnological application of protein Leuc-B isolated from *Bothrops leucurus* venom as a prototype for antitumoral radiopharmaceutical

Lucilene Marcia Gabriel

ABSTRACT

According to the report of the International Agency for Research on Cancer, the growth of this disease implies the death of 17 million people a year by 2030. Although the knowledge on development of cancer is growing considerably, just a few advances in the diagnosis and therapy has been achieved. Faced with this scenario, it is clear the need for new substances more specific with low toxicity to the patient, which can be used for diagnosis and treatment of cancer. Membrane receptors overexpressed in tumor cells are promising target candidates for development of diagnostic and therapeutic tools.

Integrins are a family of heterodimeric cell surface adhesion receptors able to recognize and bind to proteins in the extracellular matrix (ECM). This recognition is mainly through the RGD domains presents in both the cell surface as in the protein from the ECM. Various integrins have been identified as regulators of tumor progression. The RGD domain is also found in some snake venoms named disintegrins. Disintegrins inhibit cell-matrix and cell-cell interactions mediated by integrins and it has been shown that these proteins are able to inhibit metastasis in processes dependent on integrin. The disintegrin-like (ECD), as well as RGD-disintegrin are also able to bind to cell surface integrins and inhibit their adhesion to the natural ligands. In this work it was purified from *Bothrops leucurus* venom (VBL), a metalloproteinase-class P-III with disintegrin-like domain (ECD), Leucurolisina B (Leuc-B). This metalloproteinase and the crude venom were used to evaluate their applicability in the differential detection of tumors. In vitro results demonstrated that both VBL and Leuc-B have potent antitumoral effect on several cancer cell lines: U87, T98, RT2 (glioblastoma), MCF7 (breast), Ehrlich and UACC (melanoma) with IC_{50} values of approximately 0.6 μ M. The morphological changes observed in these strains when treated with Leuc-B, and data from the DAPI staining solution and acridine/ethidium bromide indicate that the antitumoral effect of these substances occurs via apoptosis. Radioactive probes of Leuc-B ($^{131}/^{125}$ I-Leuc-B) were synthesized with high specific activity and high radiochemical purity. Biodistribution studies, performed by intravenous injection and intratumoral flow in mice bearing Ehrlich tumor showed a significant tumor uptake of Leuc-B ($p < 0.05$). These results show the potential of Leuc-B as a template for the development of drugs and radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy of tumors.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Tipos de câncer mais incidentes, estimados para o ano de 2010, na população brasileira (INCA, 2010).....	30
FIGURA 2 – Desenho esquemático da estrutura geral de um radiofarmáco.....	34
FIGURA 3 – Esquema da formação de raios gama a partir da aniquilação de pósitrons (Robilota, 2006).....	35
FIGURA 4 – Ilustração esquemática das fases do ciclo celular (HOCHEGGER & SHUMICHI TAKEDA, 2008).....	40
FIGURA 5 – Complexos ciclinas/cdks reguladores do ciclo celular (HOCHEGGER & SHUMICHI TAKEDA, 2008).....	41
FIGURA 6 – Mecanismos de ativação e inativação do complexo CDK1/ciclina B. CDK (ciclina dependente de quinase), MPF (fator promotor de mitose), Y15 (tirosina 15) T161 (treonina 161), CAK (quinase ativadora de CDK), P (fosfato) (LODISH et al, 2008).....	41
FIGURA 7 – Regulação transicional de E2F (JONHONSON & WALKER, 1999).....	42
FIGURA 8 – Distinção das diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular por apoptose versus necrose (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007).....	44
FIGURA 9 – Representação esquemática da via extrínseca de ativação da apoptose (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007).....	46
FIGURA 10 – Desenho esquema da via apoptótica intrínseca ou mitocondrial. (SOPRANI, 2008).....	47
FIGURA 11 – Representação esquemática da estrutura das sub-unidades α e β das integrinas (SILVA et al, 2007).....	50
FIGURA 12 – Mecanismo de sinalização mediado por integrinas (JONES & WALKER, 1999).....	53
FIGURA 13 – Indução da transcrição de ciclina D1 a partir da ativação de ERK (PU & STREULI, 2002).....	54
FIGURA 14 – Representação esquemática da angiogênese (SILVA et al, 2007).....	55
FIGURA 15 – A seqüência tripeptídica RGD (SILVA et al, 2007).....	57

FIGURA 16 – Mecanismo de ativação do receptor ativado por protease. Proteinases clivam o domínio N terminal (1) liberando o novo N terminal, que age como um ligante que se liga ao próprio receptor (2) para induzir uma cascata de sinais intracelulares (3) (VERGNOLLE, 2005).....	58
FIGURA 17 – <i>Bothrops leucurus</i> e sua distribuição geográfica. Fêmea adulta do município de Quebrângulo, Estado de Alagoas. (CARDOSO, 2003).....	64
FIGURA 18 – Câmara de Neubauer.....	73
FIGURA 19 – Cromatografia de filtração molecular do veneno bruto de <i>B. leucurus</i> em Sephacryl S-200.....	82
FIGURA 20 – Cromatografia de filtração molecular do fração 2 em Sephacryl S-300.	83
FIGURA 21 – Cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose CL-6B.....	84
FIGURA 22 – Análise da Leuc-B purificada por SDS-PAGE (gel 12%).....	86
FIGURA 23 – Efeito citotóxico da PBL sobre células RT2.....	87
FIGURA 24 – Efeito citotóxico da Leuc-B sobre células RT2.....	87
FIGURA 25 – Efeito citotóxico da PBL sobre células T98.....	88
FIGURA 26 – Efeito citotóxico da Leuc-B sobre células T98.....	88
FIGURA 27 – Efeito citotóxico da PBL sobre células U87.....	89
FIGURA 28 – Efeito citotóxico da Leuc-B sobre células U87.....	89
FIGURA 29 – Efeito citotóxico da PBL sobre células CAE.....	90
FIGURA 30 – Efeito citotóxico da Leuc-B sobre células CAE.....	90
FIGURA 31 – Efeito citotóxico da PBL sobre células MCF7.....	91
FIGURA 32 – Efeito citotóxico de Leuc-B sobre células MCF7.....	91
FIGURA 33 – Efeito citotóxico da PBL sobre células UACC.....	92
FIGURA 34 – Efeito citotóxico da Leuc-B sobre células UACC.....	92
FIGURA 35 – Fotomicrografia óptica de células RT2 tratadas com (A) PBL e (B) Leuc-B: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com PBL e Leuc-B.....	94
FIGURA 36 – Fotomicrografia óptica de células T98 tratadas com (A) PBL e (B) Leuc-B: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com PBL e Leuc-B.....	95

FIGURA 37 – Fotomicrografia óptica de células U87 tratadas com (A) PBL e Leuc-B: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com PBL e Leuc-B.....	96
FIGURA 38 – Fotomicrografia óptica de células CAE tratadas com (A) PBL e (B) Leuc-B: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com PBL e Leuc-B.....	97
FIGURA 39 – Fotomicrografia óptica de células MCF7 tratadas com (A) PBL e (B) Leuc-B: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com PBL e Leuc-B.....	98
FIGURA 40 – Fotomicrografia óptica de células UACC tratadas com (A) PBL e (B) Leuc-B: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com PBL e Leuc-B.....	99
FIGURA 41 – Análise do DNA cromossomal de células RT2, T98 e U87 tratadas com Leuc-B: (A) controle, (B) 0,7 µM de Leuc-B e (C) 3 µM de Leuc-B. As células foram coradas com DAPI, após 24 horas de tratamento com Leuc-B.	100
FIGURA 42 – Análise do DNA cromossomal de células CAE, MCF7, UACC tratadas com Leuc-B: (A) controle, (B) 0,7 µM e (C) 3 µM de Leuc-B. As células foram coradas com DAPI, após 24 horas de tratamento com Leuc-B.....	101
FIGURA 43 – Análise do DNA cromossomal de células RT2, T98 e U87 tratadas com Leuc-B: (A) controle, (B) 0,7 µM de Leuc-B e (C) 3 µM de Leuc-B: As células foram coradas com laranja de acridina/brometo de etídio, após 24 horas de tratamento com Leuc-B.....	102
FIGURA 44 – Análise do DNA cromossomal de células CAE, MCF7 e UACC tratadas com Leuc-B: (A) controle, (B) 0,7 µM de Leuc-B e (C) 3 µM de Leuc-B. As células foram coradas com laranja de acridina/brometo de etídio, após 24 horas de tratamento com Leuc-B.....	103
FIGURA 45 – O controle de qualidade da ¹²⁵ I – Leuc-B, por cromatografia em papel Whatman com metanol saturado com iodeto de potássio como fase móvel. Depois da corrida as fitas foram cortadas e radioatividade foi medida em um contador gama com a eficiência de 82% para ¹²⁵ I.....	104
FIGURA 46 – O controle de qualidade da ¹³¹ I – Leuc-B, por cromatografia em papel Whatman com metanol saturado com iodeto de potássio como fase móvel.....	105
FIGURA 47 – Estudo de estabilidade em soro fetal bovino da ¹²⁵ I-Leuc-B.....	106
FIGURA 48 – Interação específica da ¹²⁵ I- Leuc-B com os receptores presentes nas membranas das células tumorais CAE, MCF7, T98, UACC.....	108
FIGURA 49 – Perfil biocinético da ¹²⁵ I-Leuc-B (%DI/g), injetada via endovenosa, em animais com tumor de Ehrlich.....	109

FIGURA 50 – Cinética de ^{125}I - Leuc-B no sangue de animais implantados com tumor de Ehrlich após injeção endovenosa.....	110
FIGURA 51 – Comparação da captação da ^{125}I -Leuc-B, no tumor de Ehrlich implantado na pata e pata normal.....	111
FIGURA 52 – Perfil biocinético da ^{125}I -Leuc-B (%DI/g), injetada via Intratumoral, em animais com tumor de Ehrlich.....	112
FIGURA 53 – Comparação da captação da ^{125}I -Leuc-B no tumor de Ehrlich implantado e pata normal.....	113
FIGURA 54 – Estudo de competição <i>in vivo</i> da ^{125}I - Leuc-B em camundongos com tumor de Ehrlich. Competição avaliada após 30 minutos de injeção.....	116
FIGURA 55 – Imagem planar de corpo inteiro de camundongos implantados com tumor de Ehrlich. As imagens foram adquiridas após 3 horas da injeção de ^{131}I -Leuc-B: (A) injeção intratumoral (1,2 MBq), (B) injeção endovenosa (7,4 MBq).....	118
FIGURA 56 – Imagem planar de corpo inteiro de camundongos implantados com tumor de Ehrlich. As imagens foram adquiridas após 24 horas da injeção de ^{131}I -Leuc-B: (A) injeção intratumoral (1,2 MBq), (B) injeção endovenosa (7,4 MBq).....	119
FIGURA 57 – Imagem planar de corpo inteiro de camundongos implantados com tumor de Ehrlich. As imagens foram adquiridas após 72 horas da injeção intratumoral de: (A) ^{131}I -Leuc-B (1,2 MBq) e (B) Iodo 131 puro.....	120

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Principais emissores de pósitrons utilizados em Medicina Nuclear e suas características.....	36
TABELA 2 - Subunidades de integrina e seus ligantes.....	51
TABELA 3 - Membros da família de surpegenes das integrinas organizadas de acordo com o receptor, designação, componentes estruturais e distribuição celular.....	56
TABELA 4 - Expressão de PAR em diversos órgãos.....	59
TABELA 5 - Purificação da metaloproteinase Leuc-B da peçonha de <i>B. leucurus</i>	85
TABELA 6 - Valores do IC ₅₀ do efeito citotóxico da peçonha bruta de <i>B. leucurus</i> e da Leuc-B em células tumorais.....	93
TABELA 7 - Avaliação da atividade biológica da Leuc-B marcada com iodeto estável (¹²⁷ I).....	107
TABELA 8 - Proporção da concentração ¹²⁵ I-Leuc-B no tumor e órgãos adjacentes após a injeção endovenosa caudal.....	111
TABELA 9 - Competição endovenosa da ¹²⁵ I-Leuc-B (%ID/g) em animais implantados com tumor de Ehrlich.....	114
TABELA 10 - Competição da ¹²⁵ I-Leuc-B (%ID/g) em animais implantados com tumor de Ehrlich.....	115
TABELA 11 - Proporção da concentração da ¹²⁵ I-Leuc-B (%ID/g) no tumor e órgãos adjacentes.....	117

ABREVIATURAS E SIGLAS

- **ATP:** Adenosina trifosfato
- **Apaf-1:** fator de ativação da apoptose
- **APC:** Fator promotor da anáfase
- **ASC:** Área sob a curva
- **Bad:** promotor de morte associado a Bcl-2
- **Bax:** proteína x associada a Bcl2
- **Bcl2:** B-linfoma celular-2
- **BSA:** albumina sérica bovina
- **BE:** Brometo de Etídeo
- **CAE:** células de carcinoma ascítico de Ehrlich
- **CAM:** Molécula de Adesão Celular
- **CDK:** Ciclina dependente de Kinase
- **CAK:** Kinase ativadora de ciclina
- **CKIs:** Inibidores de kinases
- **Caspases:** cysteine-dependent aspartate-specific proteases
- **CEBIO:** Centro de bioterismo
- **CNEN:** Comissão Nacional de Energia Nuclear
- **CDTN:** Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
- **COL:** Colágeno
- **DAPI:** 4',6- diamidina- 2' - fenindole dihidroclorido
- **DMC:** Dimetilcaseína
- **DMEM:** meio *Dulbecco's modified Eagle's*
- **DMSO:** dimetilsulfóxido
- **DNA:** ácido desoxirribonucléico
- **EBNA-5 EBV :** Epstein Barr vírus
- **ECD:** Glutamato – Cisteína - Aspartato
- **E2F:** Fator de transcrição eucariótico
- **EPI:** Epigrilin
- **EILDV:** Glu-Ile-Leu-Asp-Val
- **ENT:** Enctatin
- **FDG:** flúordeoxiglicose
- **FGF:** fator de crescimento de fibroblasto (*fibroblast growth factor*)
- **FB:** Fibrinogênio
- **FX:** Fator X
- **FUNED –** Fundação Ezequiel Dias
- **HPV:** Human Papiloma Virus
- **HBx:** vírus da hepatite B
- **IE84:** Citomegalovírus
- **IC3B:** Sistema do do complemento
- **KA:** Kalanin
- **KI:** Iodeto de Potássio
- **LA:** laranja de acridina
- **LM:** Laminina
- **LOH:** Perda de heterozigose
- **Leuc-B:** Leucurolisina B
- **MCF7:** Carcinoma mamário
- **M:** Mitose

- **MEC:** Matriz extracelular
- **MO:** microscópio óptico
- **MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
- **MPF:** Fator promotor de Mitose
- **OST:** Osteopontin
- **PBS:** tampão fosfato
- **PBL:** Peçonha bruta de *Bothrops leucurus*
- **PAR:** Receptor ativado por protease
- **PDGF:** fator de crescimento derivado de plaqueta
- **PN:** Pata normal
- **PT:** Pata com tumor
- **PET:** Tomografia por Emissão de Pósitron
- **P21:** Proteína 21
- **P27:** Proteína 27
- **P53:** Proteína 53
- **RGD:** Arginina-Glicina-Aspartato
- **RGDS:** Arg-Gly-Asp-Ser
- **pRb** – proteína do retinoblastoma
- **Ras-MAPK:** via de sinalização de proteína kinase ativada por mitógeno (*Rasmitogen activated protein kinase*)
- **RM:** Ressonância Magnética
- **RNA:** ácido ribonucléico
- **RT2** – linhagem celular de glioblastoma murino p-53 selvagem
- **SBCAL** - Sociedade Brasileira em Ciência de Animais de Laboratorio
- **SDS:** duodecil sulfato de sódio
- **SDS-PAGE** –Eletroforese em gel de poliacrilamida
- **SFB:** soro fetal bovino
- **SPECT:** Tomografia por Emissão de Fóton Único
- **SVMPs:** metaloproteinases de veneno de serpentes
- **SV40-T:** vírus SV40)
- **T98** – linhagem celular de glioblastoma humano p53-mutante
- **TEMED:** N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
- **TFA:** ácido trifluoroacético
- **TGF:** fator de crescimento tumoral
- **TC:** Tomografia Computatorizada
- **TE:** Tenascin
- **TNF:** fator de necrose tumoral
- **TNFR:** receptores de fator de necrose tumoral
- **Tris:** trishidroximetilaminometano
- **U87:** linhagem celular de glioblastoma humano
- **UACC:** linhagem celular de melanoma humano
- **Vd:** Volume de distribuição
- **VEGF:** fator de crescimento vasoendotelial (*Vascular endothelial growth factor*)
- **Vn:** Vitronectina
- **VCAM:** Molécula de Adesão Vasucular
- **VWF:** Fator Von Willebrand

LISTA DE SÍMBOLOS

- **%DI:** porcentagem de dose injetada
- **%DI/g:** porcentagem de dose injetada por grama
- **µg:** micrograma
- **µL:** microlitro
- **µM:** micromolar
- **¹¹B:** boro-11
- **¹¹C:** carbono-11
- **CaCl₂:** Cloreto de Cálcio
- **¹²⁵I:** iodo-125
- **¹³¹I:** iodo-131
- **¹²⁵I-Leuc-B-** Leuc-B radiomarcada com ¹²⁵I
- **¹²⁵I-Leuc-B-** Leuc-B radiomarcada com ¹³¹I
- **¹³N:** nitrogênio-13
- **¹⁵O:** oxigênio-15
- **¹⁸F:** flúor-18
- **Ca+2:** cálcio
- **Bq:** Becquerel
- **Ci:** Curie
- **NaCl:** Cloreto de sódio
- **²⁰¹Ta:** tálio-201
- **⁶⁷Ga:** gálio-67
- **^{99m}Tc:** tecnécio-99 metaestável
- **⁸²Rb:** Rubídio 82
- **°C:** graus Celsius
- **CuSO₄:** Sulfato de cobre
- **Na₂CO₃:** Carbonato de Sódio
- **eV:** eletrônvolt
- **kDa:** kilodáton
- **keV:** kiloeletrônvolt
- **h:** horas
- **Na¹²⁵I:** iodeto de sódio contendo o radioisótopo ¹²⁵I
- **M:** Molar
- **mCi:** Milicurie
- **MBq:** megabequerel
- **Mg⁺²:** Magnésio
- **min:** minutos
- **T_{1/2}:** meia vida
- **UV:** ultravioleta

Sumário

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 CÂNCER.....	24
2.2 CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS CANCEROSAS	24
2.3 FORMAÇÃO DOS TUMORES	25
2.4 CÂNCER: CAUSAS E DADOS ESTATÍSTICOS	29
2.5 TRATAMENTO E DIAGNÓSTICO DO CÂNCER.....	30
2.6 A NECESSIDADE DA BUSCA DE NOVOS COMPOSTOS PARA TRATAMENTO E DIAGNÓSTICO DO CÂNCER.....	37
2.7 CICLO CELULAR E CÂNCER.....	39
2.8 APOPTOSE: MORTE CELULAR PROGRAMADA E CÂNCER	43
2.9 INTEGRINAS	48
2.10A SEQUÊNCIA RGD	57
2.11 RECEPTOR ATIVADO POR PROTEASE (PAR).....	58
2.12 TOXINAS PRESENTES NA PEÇONHA DAS SERPENTES	60
2.13 A ESPÉCIE <i>BOTHROPS LEUCURUS</i>	63
3 JUSTIFICATIVA	66
4 OBJETIVOS	68
4.1 OBJETIVOS GERAIS	68
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	68
5 MATERIAL E MÉTODOS	69

5.1 INFRAESTRUTURA	69
5.2 A PEÇONHA	69
5.3 PURIFICAÇÃO DA Leuc-B.....	70
5.3.1 Cromatografia de filtração molecular em Sephacryl – S200.....	70
5.3.2 Cromatografia de filtração molecular em Sephacryl – S300.....	70
5.3.3 Cromatografia de troca iônica DEAE Sepharose CL-6B	71
5.4 ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA	71
5.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS -PAGE)	71
5.6 OS ANIMAIS.....	72
5.7 CULTIVO CELULAR.....	73
5.8 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE <i>IN VITRO</i> DA PBL E DA LEUC-B EM CÉLULAS TUMORAIS	74
5.9 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS	75
5.10 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DO DNA CROMOSSOMAL INDUZIDAS PELA LEUC-B ATRAVÉS DA COLORAÇÃO COM DAPI	75
5.11 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DO DNA CROMOSSOMAL INDUZIDAS PELA LEUC-B ATRAVÉS DA COLORAÇÃO COM Laranja de acridina/Brometo de etídio.....	76
5.12 SÍNTESE DA SONDA RADIOATIVA COM OS RADIOISÓTOPOS ¹²⁵ I E ¹³¹ I.....	76
5.13 ESTABILIDADE DA MOLÉCULA DE LEUC-B MARCADA COM ¹²⁵ I EM SORO FETAL BOVINO	78
5.14 AVALIAÇÃO DA MANUTENÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA LEUC-B MARCADA COM IODO (I).....	78
5.15 ENSAIOS DE INTERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ¹²⁵ I-LEUC-B COM ALVOS DE AÇÃO PRESENTES NA MEMBRANA DE CÉLULAS TUMORAIS.....	79

5.16 EXPERIMENTOS DE BIODISTRIBUIÇÃO E DETECÇÃO DE SÍTIOS TUMORAIS <i>IN VIVO</i>	79
5.17 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL USO DA ¹³¹ I-LEUC-B PARA RADIODIAGNÓSTICO NA MEDICINA NUCLEAR	80
5.18 CÁLCULOS FARMACOCINÉTICOS	81
5.19 ANÁLISE DOS DADOS	81
5.20 FINANCIAMENTO	81
6 RESULTADOS	82
6.1 PURIFICAÇÃO DA Leuc-B	82
6.1.1 CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO MOLECULAR EM SEPHACRYL – S200 ...	82
6.1.2 CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO MOLECULAR EM SEPHACRYL – S300 ...	83
6.1.3 CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DEAE SEPHAROSE CL-6B	83
6.2 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS -PAGE)	85
6.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE IN VITRO DE PBL E DA LEUC-B EM CELULAS TUMORAIS	86
6.4 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS	93
6.5 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DO DNA CROMOSSOMAL INDUZIDAS PELA LEUC-B ATRAVÉS DA COLORAÇÃO COM DAPI	99
6.6 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DO DNA CROMOSSOMAL INDUZIDAS PELA LEUC-B ATRAVÉS DA COLORAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA/BROMETO DE ETÍDIO	101
6.7 SÍNTESE DA SONDA RADIOATIVA UTILIZANDO OS RADIOISÓTOPOS ¹²⁵ I E ¹³¹ I	103
6.8 AVALIAÇÃO DA MANUTENÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA LEUC-B IODADA.	106

6.9 ENSAIOS DE INTERAÇÃO DA ¹²⁵ I-Leuc-B RADIOMARCADA COM O ALVO DE AÇÃO presentes na membrana de células tumorais	107
6.10 EXPERIMENTOS DE BIODISTRIBUIÇÃO E DETECÇÃO DE SÍTIOS TUMORAIS IN VIVO	108
6.11 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL USO DA ¹³¹ I-LEUC-B PARA RADIODIAGNÓSTICO NA MEDICINA NUCLEAR	117
7 DISCUSSÃO	121
8 CONCLUSÃO.....	129
9 PERPECTIVAS FUTURAS	130
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
APÊNDICE A - ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DO DNA ATRAVÉS DA COLORAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA/BROMETO DE ETÍDIO.....	142
APÊNDICE B - FARMACOCINÉTICA	143
ANEXO - 1	146
ANEXO - 2.....	147
ANEXO 3 - RESUMO.....	148
ANEXO 4 - RESUMO.....	149
ANEXO 5 - TRABALHO COMPLETO	150
ANEXO 6 - RESUMO.....	151
ANEXO 7 - RESUMO.....	152

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de alterações patológicas que se caracteriza pelo crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida (INCA, 2010).

O câncer é originado devido ao acúmulo de mutações nos genes que controlam o crescimento (ciclo celular) e a diferenciação celular (BORGES-OSÓRIO & ROBINSON, 2001). Tais mutações ocorrem em decorrência da exposição a fatores químicos, físicos e biológicos, bem como podem ser hereditárias ou adquiridas somaticamente (MONTESANO & HALL, 2001).

O tratamento do câncer pode ser feito através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessário combinar a radioterapia e a quimioterapia para obter um resultado melhor do tratamento.

Mesmo sendo eficazes no tratamento de diversos tipos de câncer, os agentes quimioterápicos convencionais agem de forma não específica, agindo também em células normais de multiplicação rápida, como as do sistema hematopoiético e as mucosas. Devido a estes fatores, a quimioterapia geralmente produz diversos efeitos tóxicos e colaterais indesejados como: mielossupressão, cicatrização deficiente, lesão do epitélio gastrointestinal; depressão do crescimento em crianças, esterilidade e teratogenicidade (WORKMAN & KAYE, 2002). Por este motivo, a cada ano, novas drogas e combinações de drogas são utilizadas em pesquisas com intuito de desenvolver quimioterápicos mais efetivos, que causem menos efeitos colaterais (SOPRANI, 2008).

Uma droga contra o câncer ideal deve matar apenas as células tumorais sem causar danos excessivos às células normais, mas até o momento não foi possível desenvolver tal

tratamento. Poucos avanços estão sendo conseguidos também para os diagnósticos de tumores, o que torna de extrema importância o desenvolvimento de novas moléculas com potencial terapêutico e diagnóstico que permitam o diagnóstico precoce e, conseqüentemente, o aumento da sobrevida do paciente.

Partindo desse mesmo princípio, pesquisadores de fármacos têm investido cada vez mais nos estudos com animais peçonhentos. Em 1949, o médico carioca Maurício Rocha e Silva observou que enzimas do veneno da jararaca — uma das serpentes mais comuns no Brasil — eram capazes de desorganizar o sistema circulatório das presas que caíam em seu bote. A análise dessa reação possibilitou a descoberta da bradicinina, uma substância ativa patenteada por uma multinacional e largamente utilizada até hoje em medicamentos para o controle da hipertensão. Ainda nas décadas de 40 e 50, o consagrado médico Vital Brazil (1865-1950), que dedicou a vida à pesquisa de soros contra venenos de várias espécies de cobras e foi um dos fundadores do Instituto Butantan em São Paulo (centro de pesquisa de biofármacos), descobriu que o veneno da cascavel já era utilizado, em quantidades bem diluídas, para amenizar as dores de pacientes com câncer. Mas este efeito só começou a ser estudado em profundidade a partir dos anos 90 e hoje, após a identificação, purificação e síntese laboratorial das moléculas contidas na peçonha desse réptil, um novo remédio da categoria dos opióides (como a morfina) está sendo testado. E os avanços não param por aí. Atualmente, várias pesquisas com outras espécies venenosas prometem resultar em novas terapias contra diversas doenças, inclusive contra o câncer (FAPESP, 2009).

Considerando a diversidade e a capacidade das atividades biológicas e farmacológicas das toxinas de animais peçonhentos que possam ser utilizadas para o tratamento de doenças, o presente trabalho teve por objetivo analisar o potencial antitumoral da peçonha de *Bothrops leucurus* e da proteína purificada Leuc-B em várias linhagens de tumores. Em seguida, foram avaliados os parâmetros farmacocinéticos, atividade citotóxica *in vitro* (potencial radioterapêutico) e a capacidade destes componentes para detecção de tumores *in vivo* e sua possível utilização como radiofármaco.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

O câncer é um termo genérico utilizado para designar um conjunto de mais de 100 doenças com características comuns que podem afetar qualquer parte do corpo. Os termos tumor maligno e neoplasia maligna são sinônimos de câncer e são resultados do crescimento descontrolado de células anormais (malignas) que podem invadir órgãos e tecidos adjacentes, podendo se disseminar para outras regiões do corpo. Essa disseminação é chamada de metástase (GABRIEL, 2007). Dividindo-se rapidamente, essas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original (INCA, 2010).

Tumores benignos raramente são ameaças para a vida. No entanto, podem causar problemas significativos se estiverem localizados em um órgão vital, como cérebro, ou intestino. Na verdade, a alteração mais significativa que um tumor benigno pode ocasionar no organismo é a invasão do território em torno do tecido normal, levando a obstrução do tecido ou órgão (TEXAS A&M UNIVERSITY, 2009).

Os tumores malignos, muitas vezes crescem rapidamente. As células não são diferenciadas, ou seja, elas não se parecem com as células a partir da qual se originou. Estas células neoplásicas emitem expansões celulares através do tecido normal, fazendo com que a excisão completa dessa massa celular seja uma tarefa praticamente impossível. Mesmo após a cirurgia radical de retirada destes tumores, frequentemente eles crescem novamente (TEXAS A&M UNIVERSITY, 2009).

2.2 CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS CANCEROSAS

As células cancerosas apresentam várias características que as distinguem das células normais (BORGES-OSÓRIO & ROBINSON, 2001) como:

- Crescimento e multiplicação descontrolado;

- Alterações morfológicas, provavelmente devido à perda da adesão com as células vizinhas;
- Perda da inibição por contato;
- Perda da afinidade celular específica;
- Propriedades imunológicas diferentes, devido à presença de antígenos tumorais específicos;
- Desdiferenciação, ou seja, as células cancerosas são menos especializadas que as células normais;
- Invasividade, propriedade que as células malignas possuem de invadir e se instalar em outros tecidos;
- Maior e mais rápida captação de glicose que as células normais.

2.3 FORMAÇÃO DOS TUMORES

As células normais apresentam uma regulação muito precisa do seu crescimento, porém este mecanismo pelo qual as células mantêm este controle é desconhecido (BORGES-OSÓRIO & ROBINSON, 2001).

Quanto à origem dos tumores, há evidências de que se originam de uma única célula (origem monoclonal), em que uma célula somática inicial escapa do controle regulatório, multiplicando-se rapidamente e dando origem aos tumores (BORGES-OSÓRIO & ROBINSON, 2001). No entanto, há alguns tipos de tumores que possuem origem policlonal, como o carcinoma de mama e neurofibromatose (MACDONALD, FORD & CASSON, 2004).

O crescimento anormal das células de tumor é resultado de sucessivas modificações genéticas e moleculares, que geralmente ocorrem e se acumulam no organismo através de décadas (CROWELL, 2005). Um tumor apresenta crescimento autônomo de suas células e se torna independente dos controles externos devido a mutações ou ativações irregulares de uma classe específica de genes que controlam o ciclo celular (PAUWELS et al, 1988).

Normalmente, as células cumprem um ciclo em que se multiplicam, crescem, diferenciam-se e morrem, obedecendo a um controle genético e a um complexo sistema de sinais bioquímicos (BORGES-OSÓRIO & ROBINSON, 2001). Este controle genético é exercido por duas classes de genes específicos: os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor.

Proto-oncogenes são genes normais no organismo, envolvidos na proliferação celular. Um proto-oncogene pode ser convertido de um gene celular normal em um oncogene por uma variedade de eventos (LOPES, OLIVEIRA & PRADO, 2002) tais como:

- Translocações e inversões – Neste processo um proto-oncogene é inserido próximo ou fusionado a um gene frequentemente transcrito, levando ao aumento da sua expressão e/ou produção de proteínas aberrantes;
- Deleções – A deleção resulta em desequilíbrio do cromossomo por perda de um segmento cromossômico, que pode ser terminal ou intersticial. A deleção tem importância oncogênica quando envolvem genes supressores do crescimento celular;
- Amplificações – Levam à expressão exacerbada de proteínas estruturalmente preservadas;
- Mutações puntiformes – mutação pontual é aquela que afeta uma única posição no gene. Este processo pode ocorrer por substituição, deleção ou adição de uma única base, podendo causar mudanças na proteína codificada pelo gene. As mutações pontuais são muitas vezes geradas por erros na duplicação do DNA ou durante o processo de transcrição do DNA para RNA;
- Inserção de DNA viral – Neste processo alguns vírus inserem seus oncogenes no genoma humano. O produto de tais oncogenes pode estimular ou inibir proto-oncogenes e anti-oncogenes.

Os mecanismos de ação dos oncogenes não estão totalmente elucidados. Alguns oncogenes produzem oncoproteínas, como a bcl-2, IE84 (Citomegalovírus), SV40-T (vírus

SV40), E6 (HPV- Human Papiloma Virus), EBNA-5 (EBV - Epstein Barr vírus) e HBx (vírus da hepatite B), que se ligam fortemente e inibem as proteínas codificadas por genes supressores do crescimento celular ou indutores da apoptose, como o p53 e o Rb. Com isso, levam à ausência de repressão da divisão ou inibição da morte celular por apoptose. Outros oncogenes agem levando à produção excessiva de receptores de membrana para fatores de crescimento, como o c-erb-B-2 (para um homólogo do fator de crescimento epidérmico) e o ret (fator ligante desconhecido). Uma terceira via é a produção autócrina de fatores de crescimento, que é observada, por exemplo, na multiplicação e ativação dos proto-oncogenes c-fos e c-sys pelo produto do oncogene viral tax (HTLV-1). Outras formas de promoção do crescimento neoplásico são a ativação de proto-oncogenes que estimulam a entrada da célula em mitose (ex. c-myc) e a produção de proteínas que simulam a ação dos transdutores de sinal dos receptores de membrana para fatores de crescimento (ex. c-ras e c-abl) (LOPES, OLIVEIRA & PRADO, 2002).

Enquanto oncogenes promovem o desenvolvimento do tumor, os genes supressores tumorais são genes recessivos cuja função normal é reprimir a divisão celular (SCHULZ, 2007). Devido a uma mutação pontual ou uma deleção estes genes podem ter sua função alterada ou até mesmo perdida, levando ao desenvolvimento dos tumores (BORGES-OSÓRIO & ROBINSON, 2001).

A perda de um alelo supressor de tumor pela exclusão ou recombinação muitas vezes leva a perda de heterozigiosidade (LOH) e de marcadores polimórficos como, por exemplo, microssatélites em sua vizinhança. Análise de LOH é um método útil para detectar supressões ou recombinações nos tumores e pode ser empregado para descobrir genes supressores de tumor em regiões do genoma que mostram LOH em algum tipo de tumor (GREENWALD et al, 1992).

O gene supressor de tumor RB1, inativado em retinoblastomas, codifica um regulador central do ciclo celular, com destaque para a transição da fase G1/S. RB1 atua ligando ao fator de transcrição E2F. A hiperfosforilalação da Rb libera o fator E2F, que irá desencadear a transcrição de genes para a síntese de proteínas essenciais para progressão do ciclo celular, dentre elas a ciclina A. A fosforilação da Rb é controlada por ciclinas, sendo que estas proteínas são reguladas por fatores mitogênicos de crescimento e quinases dependentes de

ciclinas (SHCWARTZ & ASSOIAN, 2001).

O gene supressor de tumor p53 é localizado no cromossomo 17p13. Sua inativação normalmente é causada pela mutação de um único exemplar, seguida por perda de alelos do cromossomo restante. Este evento foi um dos primeiros identificados na tumorigênese dos astrocitomas, sendo descrita em aproximadamente 60% de todos os tumores de origem astrocitária. A proteína p53 atua basicamente como um fator de transcrição, ativando moléculas reguladoras do ciclo celular, resposta aos danos no DNA, apoptose, diferenciação celular e angiogênese (formação de novos vasos).

Nas respostas aos danos genéticos, por exemplo, a proteína p53 pode induzir a expressão de GADD-45, que promove a parada do ciclo celular na fase G₂, provavelmente através da associação com o complexo ciclina B/CDK1, e bloqueia a replicação do DNA, induzindo o reparo do mesmo. A p53 também atua diretamente na interrupção do ciclo celular que ocorre tardiamente na fase G₁, sendo causada pela transcrição p53-dependente do inibidor da CDK, p21. O gene p21 inibe os complexos de ciclina/CDK e, portanto, impede a fosforilação da pRb necessária para entrada das células na fase S. Essa pausa no ciclo celular é favorável, visto que permite que a célula tenha tempo suficiente para reparar a lesão do DNA, causada pelo agente mutagênico (FARIA & PATROCIONIO, 2007).

A proteína p53 selvagem é ligeiramente expressa em células normais depois de um curto período de meia-vida (20-30min). Contudo, a sua versão mutante (inativa) é altamente estável, promovendo o seu acúmulo nas células e possibilitando sua detecção (FARIA & PATROCIONIO, 2007).

Os sinais bioquímicos que as células recebem, processam e interpretam permitem que elas continuem ou não a multiplicar-se e diferenciar-se em células especializadas são devido a diversos fatores como:

- a) fatores de crescimento, que transmitem sinais de uma célula a outra, estimulando ou inibindo a multiplicação celular, como os fatores de crescimento plaquetário (PDGF), fatores de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento tumoral (TGF), dentre outros;

b) receptores de fatores de crescimento, localizados na superfície celular que, ao serem ativados, iniciam um processo conhecido como transdução de sinal através da liberação de moléculas proteíno-quinases, responsáveis por desencadear uma série de reações de fosforilação no interior da célula, enviando, assim, mensagens ao núcleo da célula;

c) fatores de transcrição nuclear, que regulam a atividade dos genes controladores do crescimento e proliferação celular e interagem com os componentes da cascata de eventos da transdução de sinal. Existem vários fatores de transcrição nuclear, como os produtos dos genes fos, jun, myb e myc (BORGES-OSÓRIO & ROBINSON, 2001).

2.4 CÂNCER: CAUSAS E DADOS ESTATÍSTICOS

As causas do câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. Os fatores de risco ambientais de câncer são denominados cancerígenos ou carcinogênicos. Esses fatores atuam alterando a estrutura genética (DNA) das células. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais (INCA, 2010).

Os fatores de risco de câncer podem ser encontrados no meio ambiente ou podem ser herdados. A maioria dos casos de câncer (80%) está relacionada ao meio ambiente, no qual encontramos um grande número de fatores de risco, tais como: fumo, exposição ao sol sem proteção, hábitos alimentares, vida sedentária, infecções (por HPV, por exemplo) e exposição a produtos químicos. Segundo pesquisas, 30% das mortes por câncer estão relacionadas a maus hábitos alimentares (consumo excessivo de carnes vermelhas e falta de fibras) e falta de exercícios físicos na idade adulta (HOSPITAL DO CÂNCER, 2009). Apesar de o fator genético exercer um importante papel na oncogênese, são raros os casos de cânceres que se devem exclusivamente a fatores hereditários, familiares e étnicos. Um exemplo são os indivíduos portadores de retinoblastoma que, em 10% dos casos, apresentam história familiar deste tumor (INCA, 2010).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2010, válidas também para o ano de 2011, apontam que ocorrerão 489.270 novos casos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão, no sexo masculino, e os cânceres de mama e de colo do útero, no sexo feminino (INCA, 2010).

Em 2010, são esperados 236.240 novos casos para o sexo masculino e 253.030 para o sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma (114 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (52 mil), mama feminina (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil) (FIG.1).

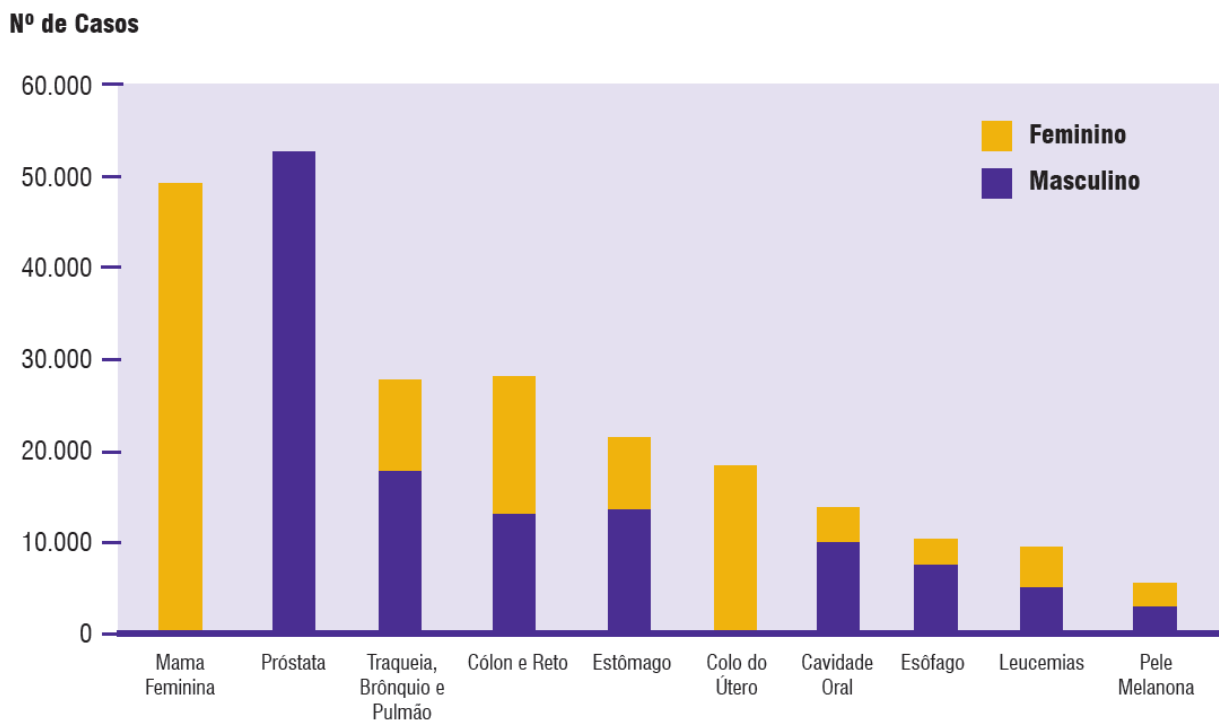


FIGURA 1 - Tipos de câncer mais incidentes, estimados para o ano de 2010, na população brasileira (INCA, 2010).

2.5 TRATAMENTO E DIAGNÓSTICO DO CÂNCER

O tratamento do câncer pode ser feito através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessário combinar a radioterapia e a quimioterapia para se obter um resultado melhor do tratamento.

O tratamento e o prognóstico são em grande parte determinados pelo estudo da gravidade e da disseminação do câncer, através de um processo denominado estadiamento.

Antes do advento da radioterapia e da quimioterapia, a cirurgia era a única possibilidade de terapia do câncer. Aproximadamente 60% dos pacientes de câncer são submetidos à cirurgia isoladamente ou em combinação com outras terapias. Como a cirurgia isolada pode curar alguns cânceres, quando tratados nos estágios iniciais, a procura de auxílio médico o mais breve possível é de vital importância (INSTITUTO DE TRATAMENTO DO CANCER, 2009). Um grande problema do tratamento cirúrgico é que muitas vezes ele se torna inviável, já que em muitos casos os tumores estão localizados em regiões inacessíveis ou próximos a estruturas vitais, ou mesmo quando o paciente está debilitado demais para resistir ao procedimento cirúrgico (IRSA, 2009).

Atualmente, cirurgias menos invasivas frequentemente são capazes de remover tumores sem afetar outras áreas do corpo. A cirurgia é frequentemente utilizada como tratamento principal para a maioria dos cânceres não metastáticos e são realizadas quando o tumor gera risco de morte ou afeta a qualidade de vida do paciente. Entretanto, na maioria dos casos a cirurgia não é capaz de curar por si só: são necessários métodos pós-cirúrgicos complementares, tais como a radioterapia e a quimioterapia (POLLOCK & MORTON, 2003).

A quimioterapia consiste no emprego de drogas para combater o câncer. Esses medicamentos, chamados quimioterápicos, atuam combatendo as células doentes, destruindo e/ou controlando seu desenvolvimento. Podem ser ministradas isoladamente (monoquimioterapia) ou combinadas (poliquimioterapia) (INCA, 2010). Uma das principais dificuldades no uso da quimioterapia para combater o câncer é que o tumor geralmente se encontra bem avançado por ocasião do diagnóstico (RANG & DALE, 2001).

Os medicamentos antineoplásicos são agrupados em várias categorias: agentes alquilantes, antimetabólitos, alcalóides vegetais, antibióticos antitumorais, enzimas, hormônios e modificadores da resposta biológica (INSTITUTO DE TRATAMENTO DO CÂNCER, 2009).

Os agentes alquilantes são drogas quimicamente reativas que interagem covalentemente com o DNA, causando quebras duplas ou simples na fita, e ligações cruzadas inter e intra-fita. Também são capazes de interagir com outras moléculas celulares, fazendo com que percam suas funções.

Os antimetabólitos são um grande grupo de drogas que interferem em certas etapas da síntese do DNA ou do RNA, impedindo a replicação celular. Além de causar os mesmos efeitos colaterais que os agentes alquilantes, certos antimetabólitos causam erupção cutânea, escurecimento da pele (aumento da pigmentação) ou insuficiência renal (INSTITUTO DE TRATAMENTO DO CANCER, 2009).

Os antibióticos antitumorais possuem diferentes modos de ação, podendo realizar ligações cruzadas com o DNA ou mesmo inibir a mitose, através da liberação de radicais livres e alterações na membrana plasmática (PARNELL & WOLL, 2003).

Os agentes antineoplásicos atualmente utilizados, em particular os que são citotóxicos, afetam, em sua maioria, apenas uma das características das células cancerosas, o processo de divisão celular, sendo, portanto, apenas antiproliferativos. Esses fármacos não exercem nenhum efeito inibitório específico sobre o poder invasivo, a perda da diferenciação ou o poder metastático. Além disso, como seu efeito principal é exercido sobre a divisão celular, eles irão afetar todos os tecidos normais que se dividem rapidamente, produzindo então, em maior ou menor grau, os conhecidos efeitos colaterais de uma quimioterapia. Ressalta-se ainda que os próprios agentes antineoplásicos podem também, em certas circunstâncias, serem carcinogênicos (BERNARD, JACQUES-SILVA & LENZ, 2003).

A radioterapia consiste no uso de grandes doses de raios de alta-energia ou partículas para destruir células cancerígenas em uma área alvo específica (BRANS et al, 2007). Uma dose pré-calculada de radiação é aplicada, por um determinado tempo, a um volume de tecido que engloba o tumor, buscando erradicar todas as células tumorais, com o menor dano possível às células normais circunvizinhas, à custa das quais se fará a regeneração da área irradiada (INCA, 2009).

As radiações ionizantes são eletromagnéticas ou corpusculares e carregam energia. Ao interagirem com os tecidos dão origem a elétrons rápidos que ionizam o meio e criam efeitos químicos, como a hidrólise da água e a ruptura das cadeias de DNA. A morte celular pode

ocorrer então por variados mecanismos, desde a inativação de sistemas vitais para a célula até sua incapacidade de reprodução.

A resposta dos tecidos às radiações depende de diversos fatores, tais como a sensibilidade do tumor à radiação, sua localização e oxigenação, assim como a qualidade e a quantidade da radiação e o tempo total em que ela é administrada. Para que o efeito biológico atinja maior número de células neoplásicas e a tolerância dos tecidos normais seja respeitada, a dose total de radiação a ser administrada é habitualmente fracionada em doses diárias iguais, quando se usa a terapia externa (INCA, 2009).

A radioterapia geralmente é usada em tumores sólidos localizados. A radiação é freqüentemente usada em combinação com outros tratamentos. Pode ser utilizada antes ou durante outros procedimentos (tratamento neoadjuvante), neste caso a radiação reduz o tamanho do tumor para realização de uma cirurgia ou quimioterapia mais efetiva. Usado posteriormente (tratamento adjuvante), destrói qualquer célula neoplásica que possa ter permanecido (INSTITUTO DE TRATAMENTO DO CÂNCER, 2009).

A detecção precoce do câncer é um passo chave para o processo de cura dos pacientes, já que o tratamento obtém maior índice de sucesso se a doença for detectada ainda em seus estágios iniciais.

Há vários métodos para diagnosticar o câncer. Dentre eles, podemos citar: biópsia, análises bioquímicas do sangue e o diagnóstico por imagem (tomografia computadorizada, raios-X, ressonância magnética, PET e SPECT).

A biópsia consiste na retirada de uma pequena amostra de tecido que é cirurgicamente removido e examinado com microscópio por um patologista para detectar a presença de células neoplásicas (câncer). Dependendo do local do tumor, algumas biópsias podem ser feitas ambulatorialmente apenas com anestesia local.

Os métodos de imagem convencionais têm importante papel na avaliação não invasiva dos pacientes com neoplasias. A tomografia computadorizada (TC), a imagem por ressonância magnética (IRM) e o ultra-som permitem caracterizar alterações anatômicas decorrentes da doença, porém, esta avaliação nem sempre é conclusiva. A presença de massa residual em pacientes com boa resposta ao tratamento, assim como a infiltração de linfonodos de pequenas dimensões, são exemplos de situações nas quais a avaliação estrutural é insuficiente (OLIVEIRA et al, 2006).

A imagem na Medicina Nuclear permite a caracterização funcional e metabólica dos tecidos, complementando os dados anatômicos e, desta forma, auxiliando no diagnóstico e, principalmente, no acompanhamento e otimização do tratamento dos pacientes com tumores. As técnicas de imagem na Medicina Nuclear são a tomografia por emissão de fóton único (SPECT) e tomografia por emissão de pósitron (PET) (TINOIS, 2005). Estas duas ferramentas de diagnósticos utilizam radiofármacos. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os radiofármacos podem ser definidos como medicamentos com finalidade diagnóstica ou terapêutica que, quando prontos para o uso, contêm um ou mais radionuclídeos. A estrutura geral de um radiofármaco cujo alvo é um receptor específico apresenta um ligante, que pode ser um peptídeo, uma proteína, um hormônio ou uma molécula orgânica específicos para o alvo a ser definido ligado a um radionuclídeo (FIG.2). Caso o radionuclídeo não se ligue diretamente à molécula de interesse, é necessário utilizar um ligante intermediário ou *linker*. Os radiofármacos diagnósticos utilizados para obtenção de imagens SPECT ou PET têm por objetivo examinar o fluxo sanguíneo, o metabolismo celular e a perfusão cardíaca, entre outros.

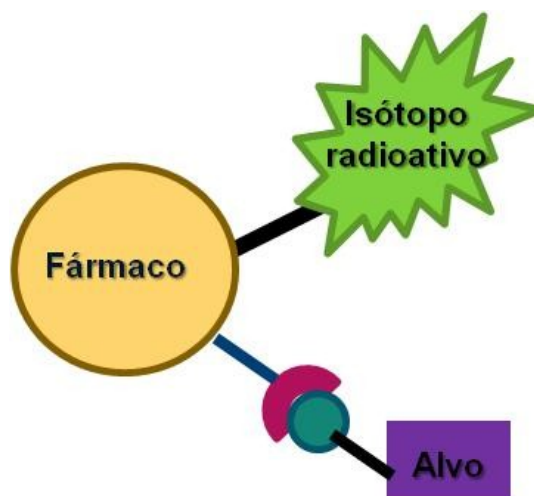


FIGURA 2 – Desenho esquemático da estrutura geral de um radiofármaco.

O PET utiliza radiofármacos, em que os radionuclídeos são emissores de pósitrons com elevada instabilidade atômica. Quando o pósitron é emitido por um núcleo instável, ele segue sua trajetória até encontrar um elétron negativo do meio, com o qual se combina. Essa união causa a aniquilação do par pósitron-elétron e a conseqüente liberação de energia na forma de dois fótons gama de 511 keV cada, de mesma direção e sentidos opostos (FIG.3) (ROBILOTTA, 2004).

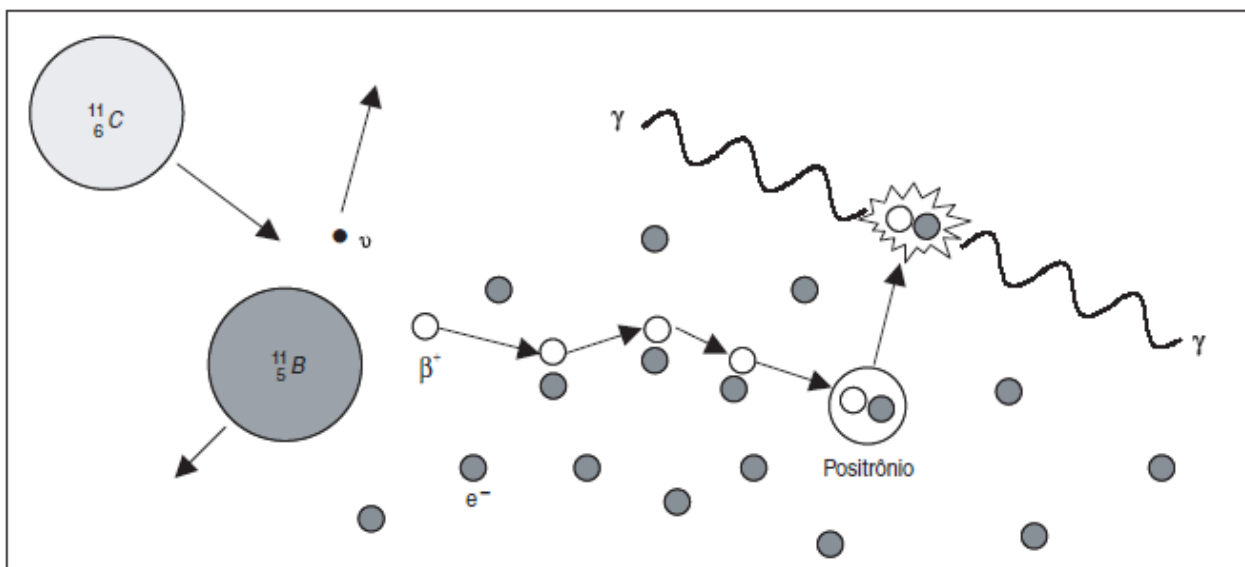


FIGURA 3 - Esquema da formação de raios gama a partir da aniquilação de pósitrons (Robilota, 2006)

Os radionuclídeos emissores de pósitron usados na medicina são produzidos por ciclotrons. A TAB. 1 mostra os principais desses radionuclídeos e algumas de suas características físicas. Os radionuclídeos ^{11}C e ^{15}O são elementos constituintes de organismos vivos, fato que os torna muito adequados para a marcação de biomoléculas. Por outro lado, como suas meias-vidas físicas são muito curtas, assim como a do ^{13}N , só podem ser utilizados se o acelerador para sua produção estiver nas dependências do próprio centro diagnóstico.

TABELA 1 - Principais emissores de pósitrons utilizados em Medicina Nuclear e suas características

Radionuclídeo	T _{1/2} (min)	E _β max (MeV)	Alcance máximo em água (mm)
Carbono 11 (C ¹¹)	20,4	0,95	5,0
Nitrogênio 13 (N ¹³)	9,96	1,197	5,4
Oxigênio 15 (O ¹⁵)	2,07	1,738	8,2
Flúor 18 (F ¹⁸)	109,8	1,650	2,4
Gálio 68 (Ga ⁶⁸)	68	1,899	9,4
Rubídio 82 (Rb ⁸²)	1,3	1,350	15,6

(Robilota, 2006).

Hoje o radionuclídeo mais utilizado para obtenção de imagem PET é o ¹⁸F, marcando a fluorodeoxiglicose (FDG), um análogo da glicose que é consumido por células ativas, de tal maneira que sua presença indica função metabólica tecidual. Os quase 110 minutos de meia-vida do ¹⁸F permitem que a FDG marcada seja transportada a locais de exame razoavelmente afastados do centro de produção (em torno de 100 km por transporte terrestre), de modo que a PET realizada com (¹⁸F)FDG é a dominante, com aplicações principalmente em oncologia e, em menor extensão, em neurologia, psiquiatria e cardiologia (ROBILOTTA, 2006).

A tomografia por emissão de um fóton único (SPECT) utiliza radiofármacos emissores gama de meia vida curta e é capaz de gerar imagens planares ou tridimensionais. Dentre os fatores de seleção para utilização de um radioisótopo estão seu tempo de meia-vida, sua disponibilidade comercial, seu tipo de emissão e a energia de sua emissão. As gama-câmaras atualmente disponíveis possuem sensibilidade para adquirir imagem a partir de fótons de energia entre 50-500 keV sendo a melhor resolução conseguida na faixa de 140 keV (HUSTINX & ALAVI, 2005).

Os radiofármacos mais comumente usados na imagem oncológica em SPECT são aqueles marcados com os radioisótopos ¹³¹I (364 keV), ⁶⁷Ga (93 keV), ²⁰¹Ta (135 e 167 keV)

e o ^{99m}Tc (140 keV). O ^{131}I é principalmente utilizado para detecção de carcinomas de tireóide, devido à alta captação de iodo por esse órgão. O ^{99m}Tc transformou-se em um traçador muito importante para diagnóstico tumoral, devido a sua disponibilidade comercial, dosimetria favorável, meia vida curta ($T_{1/2} = 6$ horas) e emissão de fóton gama único de energia favorável para a imagem (THRALL et al, 2003; VENNERI, 2007).

2.6 A NECESSIDADE DA BUSCA DE NOVOS COMPOSTOS PARA TRATAMENTO E DIAGNÓSTICO DO CÂNCER

O conhecimento sobre as neoplasias têm crescido bastante mas, no entanto, poucos avanços no diagnóstico e na terapia foram obtidos. Diante de tal cenário, fica clara a necessidade do desenvolvimento de novas substâncias que apresentem baixa toxicidade para o organismo e que possam ser utilizadas tanto para o diagnóstico quanto para o tratamento das neoplasias.

Uma droga anticâncer ideal deve matar ou incapacitar as células tumorais sem causar danos excessivos às células normais. No entanto, as drogas mais utilizadas no tratamento das neoplasias afetam tanto células malignas quanto as células saudáveis, causando, conseqüentemente, efeitos colaterais indesejados (SOPRANI, 2008).

Considerando a necessidade de novas abordagens para o tratamento do câncer, estudos bioquímicos e moleculares dos mecanismos de transdução de sinal celular possibilitaram um melhor entendimento da biologia da célula neoplásica. Atualmente, o maior esforço das pesquisas está concentrado em utilizar biomoléculas que reconheçam seletivamente estruturas moleculares que só existam na superfície tumoral (WINBERG et al, 2005). Determina-se como um ótimo alvo molecular aquele presente somente nas células tumorais, que seja facilmente detectado através de exames de rastreamento e que tenha relação direta com o processo oncogênico (SOPRANI, 2008).

Há atualmente 209 novas drogas sendo investigadas, inclusive em fase de estudo III. A maioria delas, baseadas nos progressos realizados no conhecimento da biologia da célula

cancerosa, se refere ao uso de alvos seletivos para atuação dos agentes antitumorais (BERNARD, JACQUES-SILVA & LENZ, 2003).

Também para o diagnóstico por imagem do câncer, diversos estudos têm sido realizados com objetivo de obter um radiofármaco que seja capaz de se dirigir específica e seletivamente para tumores malignos, dessa forma seria possível a detecção de tumores mais rapidamente e, conseqüentemente, a realização do tratamento nos estágios iniciais da doença.

O grande objetivo dos pesquisadores é desenvolver uma molécula com atividade antitumoral passível de ligação a um radionuclídeo, que se concentre somente nos tecidos tumorais. Estes radiofármacos seriam mais vantajosos já que a união da droga antitumoral ao radionuclídeo seria útil não somente para diagnóstico, mas também para o tratamento, uma vez que podem ser utilizadas como carreadoras diretas de radiação gama ou beta para a região tumoral (PAUWELS et al, 1988). O interesse na radiomarcagem de moléculas que possam ser utilizadas na oncologia tem crescido muito nos últimos anos e peçonhas de animais têm sido muito utilizadas na busca de terapias alternativas para o tratamento de tumores.

A grande quantidade de pesquisas com substâncias sintéticas tem contribuído relativamente pouco para o desenvolvimento de novas drogas e radiofármacos com potencial antitumoral. No entanto, a busca desses protótipos tem sido significativamente bem sucedida quando desenvolvida a partir de produtos naturais (EXTERMANN et al, 2002; LEWIS & GARCIA, 2003).

Tumores cerebrais, principalmente os glioblastomas multiformes, são de difícil tratamento, resultando em baixo prognóstico dos pacientes. O tratamento tradicional consiste em cirurgia para retirada do tumor seguida de radioterapia e quimioterapia, mas a sobrevivência do paciente é curta (CHATTERJEE et al, 2000). Recentemente, Soares, (2007) demonstrou o potencial antitumoral para glioblastomas da peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus* e Pujatti et al, (2005) demonstrou que esta peçonha pode ser radiomarcada com ^{99m}tecnécio (^{99m}Tc) e utilizada em ensaios de biodistribuição. A rodostomina (*Calloselasma rhodostoma*) inibiu a adesão e a migração de células de carcinoma mamário e de próstata de maneira dose-dependente (YANG et al, 2005) e a saxatilina (*Gloydus saxatilis*), além de inibir a agregação

plaquetária, também inibe a angiogênese e metástases pulmonares de melanoma em modelos animais. Também foi demonstrado que a saxatilina é capaz de bloquear a proliferação de células de câncer de ovário através da inibição da expressão da interleucina 8 (IL-8) (KIM et al, 2007).

Desta forma, as toxinas originadas de serpentes representam uma vasta fonte de novos componentes farmacológicos e moléculas capazes de se tornarem moldes para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

2.7 CICLO CELULAR E CÂNCER

O ciclo celular envolve uma série de eventos que resultam na duplicação do DNA e de componentes celulares, tais como as organelas. Em células normais, este processo é cuidadosamente controlado, mas em células tumorais, mutações nos genes associados ao controle do ciclo celular interferem neste processo. As fases do ciclo celular são conhecidas há cerca de 40 anos, mas só nos últimos anos que os genes que estão envolvidos no controle do processo de divisão celular foram identificados (MACDONALD, FORD & CASSON, 2004).

O ciclo celular é dividido em quatro fases distintas: fase G₁, fase S e fase G₂, que, em conjunto, constituem a interfase. Logo após a interfase ocorre a fase M (Mitose) (FIG. 4). A duração do ciclo celular varia consideravelmente de uma espécie e de um tecido para outro, mas normalmente é em torno de 16-24 h. No G₁, as células estão se preparando para sintetizar o DNA. A duração desta fase é variável. Durante a fase S, o DNA é replicado e as histonas são sintetizadas. No final da fase S, o conteúdo de DNA da célula dobrou e os cromossomos foram replicados. No G₂, as células estão se preparando para a divisão. Células que não estão se dividindo são removidas do ciclo celular e classificadas no estado G₀ (gap-0) (MACDONALD, FORD & CASSON, 2004).

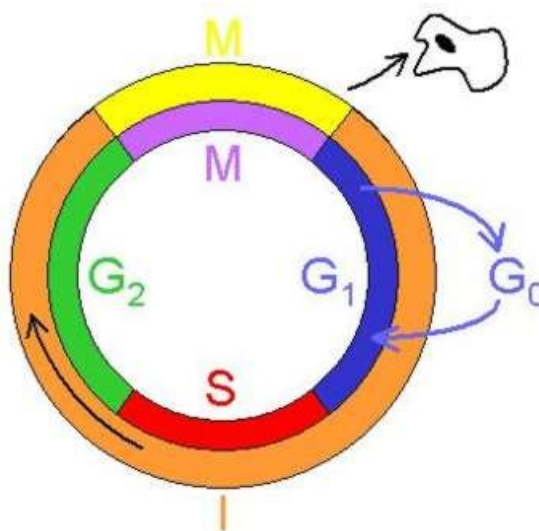


FIGURA 4 – Ilustração esquemática das fases do ciclo celular (HOCHEGGER & SHUMICHI TAKEDA, 2008).

Os eventos do ciclo celular são fortemente controlados em pontos específicos denominados pontos de checagem. Existem três destes pontos ao longo do ciclo celular: o na transição da fase G₁/S, na transição da G₂/M e na fase M (mitose) (MOLINARI, 2005).

A entrada e a progressão das células através do ciclo celular de uma fase para outra é cuidadosamente controlada pela ativação e posterior degradação ou alteração de uma série de ciclinas e seus parceiros, as quinases dependentes de ciclina (CDKS). Além disso, tem sido demonstrado mais recentemente que outro grupo de proteínas, os inibidores de ciclinas-dependentes de quinase (CKiS), é importante para a transdução de sinal e de coordenação de cada fase do ciclo celular (MACDONALD, FORD & CASSON, 2004). Existem vários complexos ciclinas/cdks e em cada fase do ciclo atua um complexo diferente (FIG 5.)

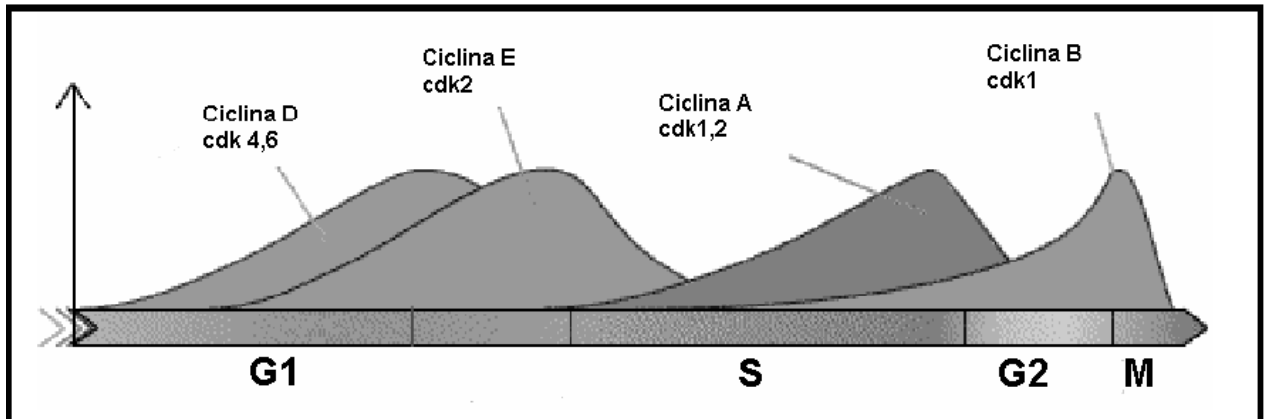


FIGURA 5 - Complexos ciclina/cdks reguladores do ciclo celular (HOCHEGGER & SHUMICHI TAKEDA, 2008).

Durante a transição da fase G2 para a fase M ocorre a ativação do MPF (Fator Promotor de Mitose) que é formado pelo complexo CDK1/ciclina B. O MPF é ativado por fosforilação da CDK1 num resíduo de treonina conservado, o T161, e pela quinase ativadora CAK (Kinase Ativadora de CDK). Por outro lado, a CDK1/ciclina B pode ser mantida num estado inativo por fosforilação dos resíduos T14 e Y15 da CDK1. Estas fosforilações inibidoras são executadas por duas quinases diferentes chamadas Wee1 e Myt1. A ativação é executada por membros da família de fosfatases cdc25 que removem essas fosforilações inibidoras do local de ligação da CDK1 ao ATP. Logo após estas fosforilações, o MPF está ativo e inicia-se o processo mitótico (FIG.6) (PERDIGÃO & TAVARES, s/a).

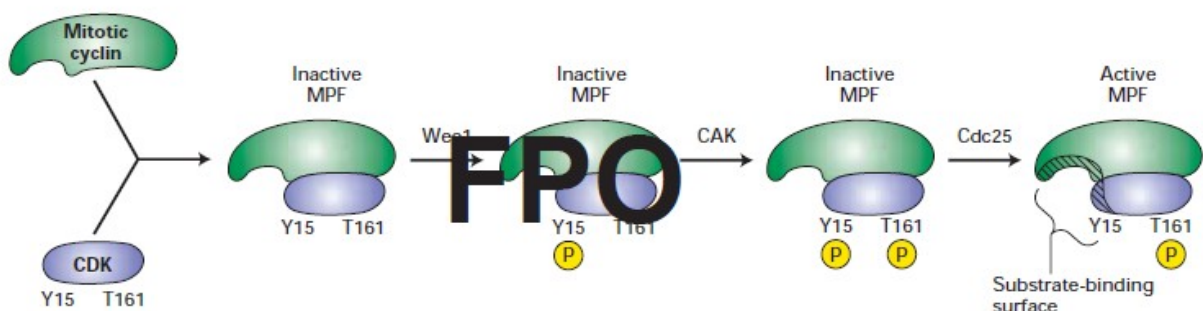


FIGURA 6 - Mecanismos de ativação e inativação do complexo CDK1/ciclina B. CDK (cinase dependente de ciclina), MPF (fator promotor de mitose), Y15 (tirosina 15) T161 (treonina 161), CAK (quinase ativadora de CDK), P (fosfato) (LODISH et al, 2008).

Após a divisão mitótica, as ciclinas relevantes (nesse caso, a ciclina B) são degradadas pela via ubiquitina-proteassoma. Nesta via, as proteínas são inicialmente conjugadas ao co-fator protéico ubiquitina e as proteínas modificadas são especificamente reconhecidas e degradadas no interior do proteassoma, um grande complexo proteolítico de múltiplas subunidades. Além das sínteses e degradação, os complexos de CDK ativos são regulados através de sua ligação aos inibidores da CDK, como p21 e p27, bem como por outras quinases e fosfatases (COTRAN, KUMAR & COLLINS, 2000).

A proteólise controlada tem um papel direto na regulação das CDKs, controlando os níveis de ciclinas e contribuindo também para outros passos do ciclo celular, tais como alterações na coesão das cromátides-irmãs, que ocorrem quando as cromátides se separam na transição metáfase/anáfase. Por exemplo, durante a mitose, diferentes ciclinas são ubiquitinadas por ação de um complexo protéico denominado APC (Fator Promotor da Anáfase). Este complexo, por associação a diferentes proteínas reguladoras, tem especificidade diferente para as várias ciclinas em diferentes alturas da mitose.

A transição G1/S também constitui outro importante ponto de controle do ciclo celular. Um dos principais controles dessa transição é obtido pelo estado de fosforilação da proteína retinoblastoma (Rb), que sofre mutação numa variedade de cânceres. Normalmente, a Rb seqüestra membros da família do fator de transcrição E2F. Por sua vez, o E2F ativado ativa a transcrição de vários genes necessários para a entrada na fase S (COTRAN, KUMAR & COLLINS, 2000) (FIG.7).

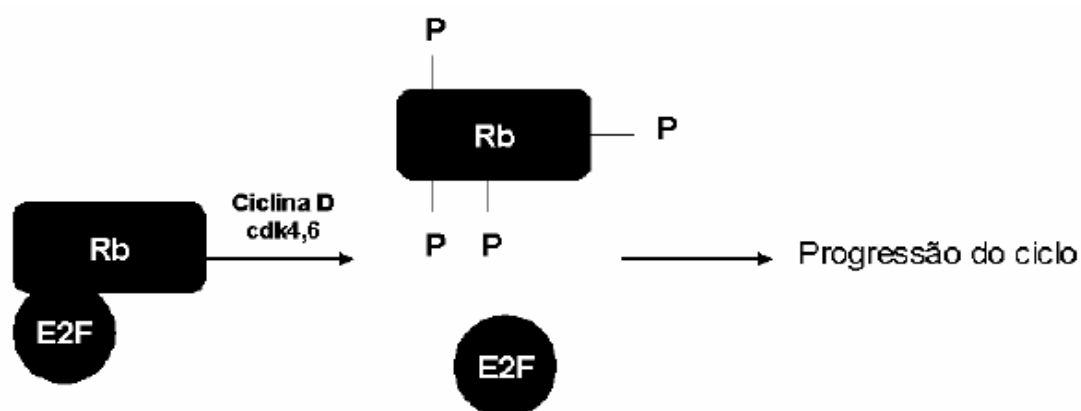


FIGURA 7 - Regulação transicional de E2F (JONHONSON & WALKER, 1999).

2.8 APOPTOSE: MORTE CELULAR PROGRAMADA E CÂNCER

O crescimento tumoral está relacionado ao balanço somatório entre proliferação e morte celular. A medida combinada de morte celular e proliferação é uma importante arma na determinação do comportamento tumoral. Estudos recentes demonstram a relevância da morte celular programada na homeostase tecidual, na organogênese e na patogenia dos tumores (FARIA, SOUZA & AARESTUP, 2005).

Apoptose ou morte celular programada é um acontecimento comum no organismo, tanto em situações fisiológicas quanto patológicas, e permite que organismos multicelulares controlem o número de células, seus tecidos e eliminem células individuais que possam trazer algum risco a sua sobrevivência.

A apoptose caracteriza-se pela ocorrência de várias alterações morfológicas nas células afetadas (SOLÁ et al, 2001). O padrão de alterações morfológicas e bioquímicas celulares associadas com a morte celular normal e certos processos fisiopatológicos incluem: formação de vacúolos citoplasmáticos, encolhimento e diminuição do contato entre as células e fragmentação do DNA (FIG.8) (ANZETTI & MELO, 2007). Quando a morte celular ocorre induzida por fatores externos, como um composto químico ou estímulo físico, não constitui um processo programado e sim uma resposta às mudanças ambientais.

A morte celular causada por necrose ocorre em virtude de uma resposta a danos severos sofridos pelas células e é caracterizada por apresentar inchaço citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e conseqüente liberação do material citoplasmático (FIG.8). Este processo leva a geração de uma resposta inflamatória, podendo fazer com que ocorra morte das células vizinhas (CURTIN, DONOVAN & COTTER, 2002).

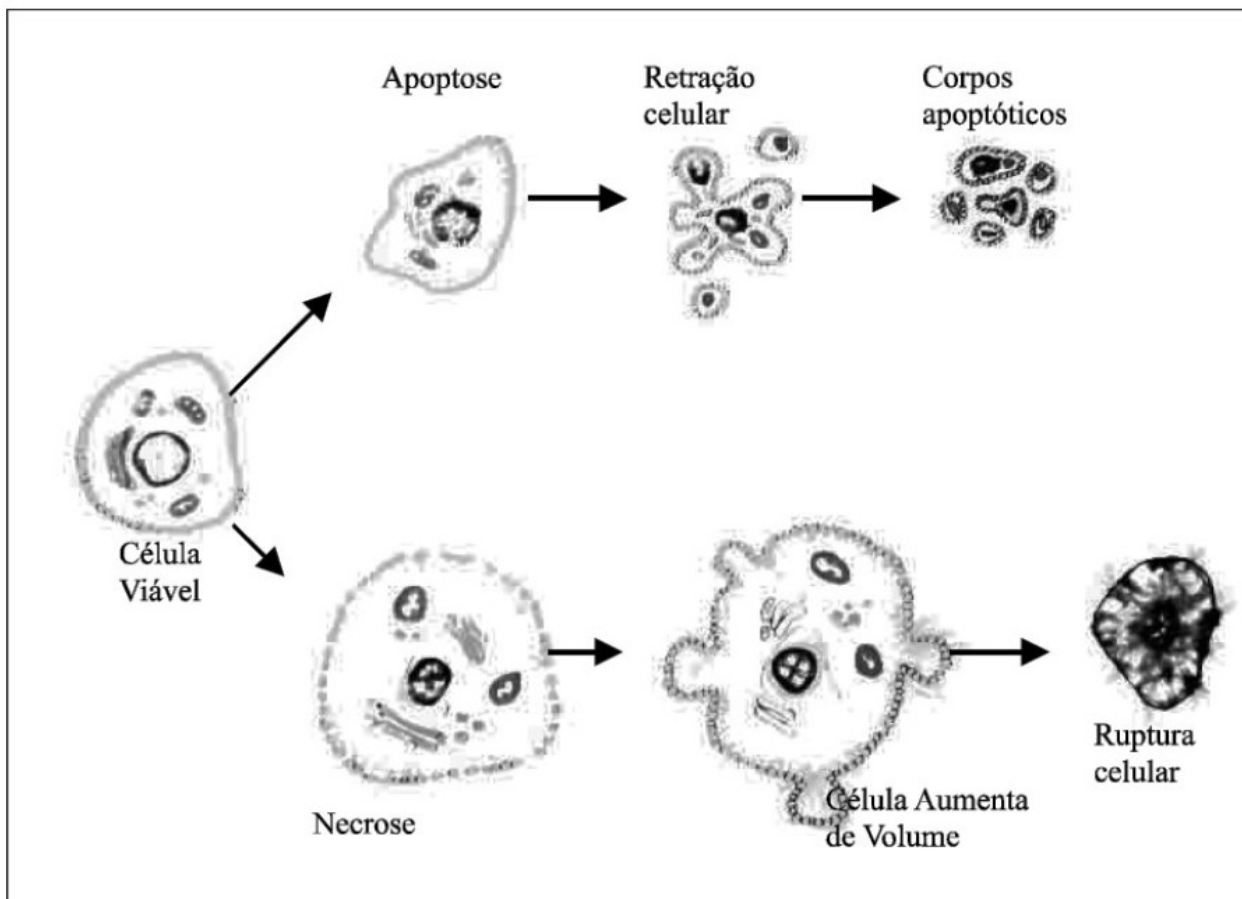


FIGURA 8 - Distinção das diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular por apoptose versus necrose. A necrose é caracterizada pela perda de integridade de membrana plasmática, floculação da cromatina, inchaço seguido de lise celular com extravasamento do conteúdo intracelular e desintegração de organelas. O processo apoptótico envolve alteração de permeabilidade de membranas, condensação da cromatina, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos sem desintegração de organelas (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007)

Durante o processo necrótico ocorrem alterações na função da mitocôndria e isso faz com que ocorra diminuição da produção de ATP, levando a uma alteração na função da bomba de Na^+/K^- e, como consequência, ocorre uma tumefação celular devido ao aumento de sódio no citoplasma. A tumefação celular é causada devido a lesões no citoesqueleto e inibição da bomba de Na^+/K^- que ocasiona alterações na permeabilidade seletiva da membrana nuclear (MCCONKEY, 1998). Já no processo apoptótico há participação de uma cascata de eventos que culminam na degradação do DNA via ativação de endonucleases,

desintegração celular e formação dos corpos apoptóticos, que são retirados do organismo rapidamente pelos macrófagos (ANZETTI & MELO, 2007).

A apoptose é essencial para manutenção e homeostase do tecido adulto e pode ser desencadeada pela via intrínseca (via mitocondrial) ou pela via extrínseca (mediada por receptores) (FARISS et al, 2005).

A via extrínseca (FIG.9) é desencadeada pela ligação a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (TNF). Esta ligação é capaz de ativar uma cascata das caspases como: caspase 3, 6, 7, 8 e 9 (ANZETTI & MELO, 2007). As caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) são proteases que desempenham um papel central na apoptose e, conseqüentemente, constituem alvos farmacologicamente atrativos para a inibição e/ou potenciação da apoptose. As caspases sinalizam para a apoptose e clivam substratos específicos, levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos. As caspases são sintetizadas como precursores inativos denominados zimogênos. Após um sinal de morte celular, as caspases são ativadas por clivagem proteolítica. Essas enzimas podem interagir com receptores de membrana ou moléculas adaptadoras que contenham domínios de morte (*death domain*), pois esses domínios também existem nas caspases e a presença deles permite essa interação (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007).

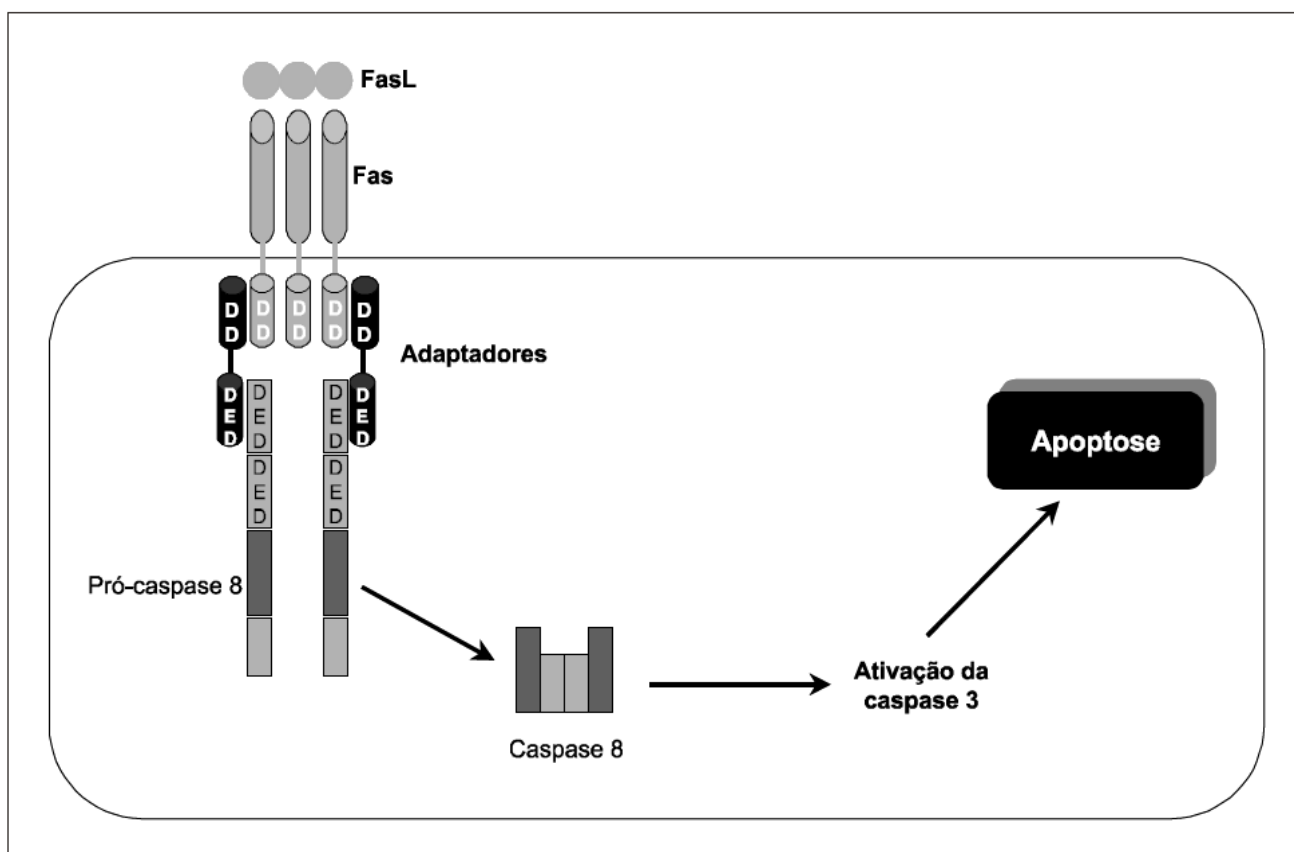


FIGURA 9 – Representação esquemática da via extrínseca de ativação da apoptose (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007).

As caspases também podem ser classificadas de acordo com seu pró-domínio e seu papel na apoptose. Caspases iniciadoras possuem pró-domínios longos, envolvidas na iniciação da cascata proteolítica. Caspases efetoras apresentam pró-domínios curtos ou inexistentes, responsáveis pela clivagem de substratos. Entre os diversos substratos das caspases pode-se citar a *mdm-2* (*murine double minute*), uma proteína que se liga à p53, mantendo-a no citoplasma. Ao ser clivada pelas caspases, essa proteína libera a p53 que se transloca para o núcleo, ativando a transcrição de genes pró-apoptóticos como o *Bax* (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007).

A via mitocondrial (FIG. 10) é ativada predominantemente com envolvimento de alterações de permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação do citocromo c para o citosol, que se liga a dATP, Apaf-1 e pró-caspase-9, formando o complexo apoptossomo. A caspase-9 ativa (iniciadora) pode então clivar as caspases efetoras subseqüentes (2, 3, 6, 7, 8, 9, e 10). Portanto, a ativação da caspase 9 mediada pelo citocromo c serve como um

mecanismo de amplificação de sinais durante o processo apoptótico. A via mitocondrial é freqüentemente ativada em resposta a danos no DNA, envolvendo a ativação de um membro pró-apoptótico da família Bcl-2 (Bax, Bid). Membros pró e antiapoptótico da família Bcl-2 regulam a liberação de citocromo c a partir da membrana mitocondrial interna. Os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 inibem a morte celular por apoptose, impedindo a formação de poros na membrana mitocondrial e, conseqüentemente, inibem o extravasamento do citocromo c para o citosol. Este se associa com Apaf-1, dATP e pró-caspase-9, formando o apoptossomo. Caspases subseqüentes são ativadas, culminando na clivagem de substratos específicos e morte celular por apoptose (ANZETTI & MELO, 2007).

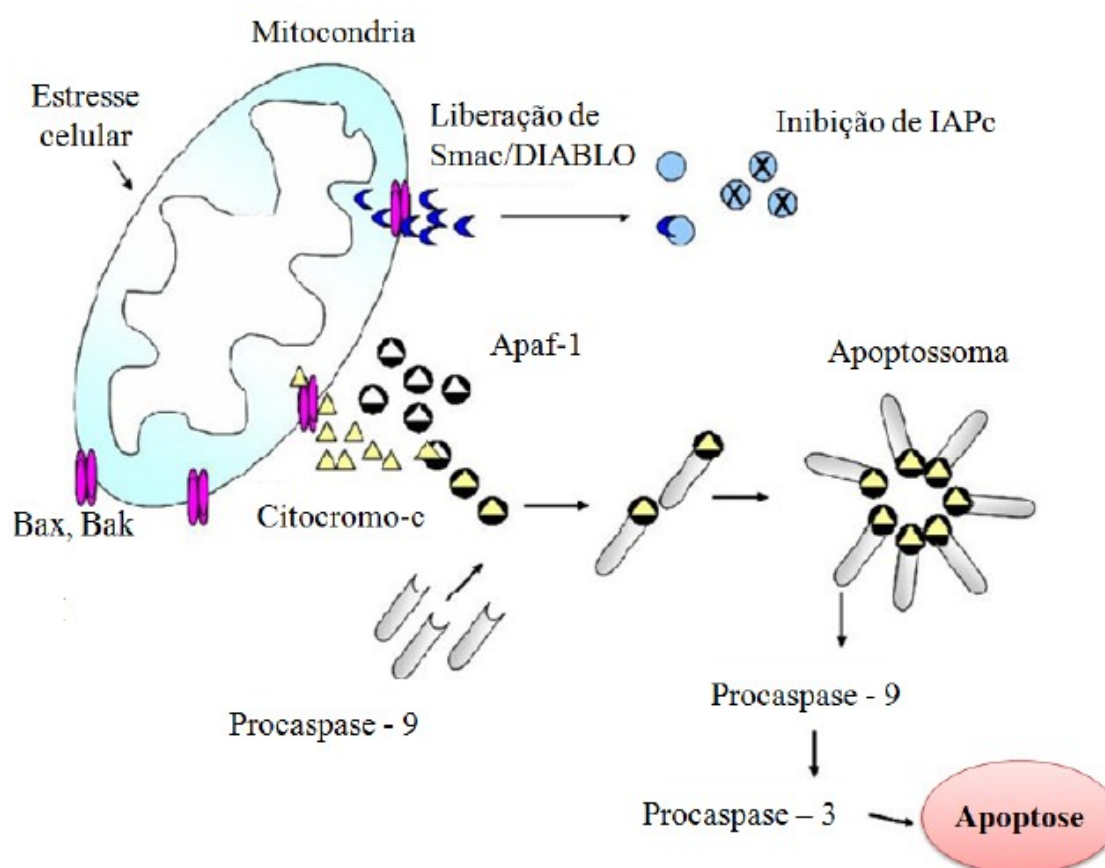


FIGURA 10 - Desenho esquema da via apoptótica intrínseca ou mitocondrial. Vários estímulos pró-apoptóticos estimulam proteínas da família Bcl2 (Bax, Bad, Bak, Bid) a formarem poros na membrana mitocondrial externa. A liberação de citocromo-c por meio desses poros permite a formação dos apoptossomos, o que ativa a caspase-9. Esta, por sua vez, ativa caspases efetoras, propagando o sinal de morte. Outras moléculas (ex. Smac/DIABLO) colaboram com a execução do sinal apoptótico, inibindo moléculas anti-apoptóticas (IAPs) (KLENER et al, 2006).

A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos como dano ao DNA levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas. Esse desequilíbrio induz a apoptose (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007).

A matriz extracelular (MEC) regula as funções celulares, tais como: crescimento, diferenciação, morte, forma, motilidade e adesão celular. Este controle é feito através da transdução de sinais da MEC para as células que, em grande parte, é mediado por receptores transmembranas integrinas, responsáveis por desempenhar um papel fundamental na organização dos componentes do citoesqueleto. Interferência no processo de adesão focal induz uma variedade de respostas celulares, que pode então provocar a morte celular. Um tipo particular de morte é a apoptose por anoikis que pode ser induzida por moléculas que degradam a ECM, como as metaloproteases de matriz (MMPs). As metaloproteinases isoladas de venenos de serpentes (SVMPs) também podem degradar as proteínas da ECM e interferir de diversas maneiras na interação das células com a matriz extracelular, através da inibição dos receptores integrina (TANJONI, et al, 2005).

A morte celular por anoikis é induzida pela inadequada interação da célula com a matriz extracelular e está envolvida em uma diversidade de processos fisiológicos e patológicos. Anoikis mantém a homeostasia de células e tecidos sendo que alterações neste processo de morte contribui para o desenvolvimento de neoplasias malignas (FRISCH & SCREATON, 2001). Todos os processos que caracterizam a apoptose, incluindo a fragmentação nuclear e formação de *blebs*, são observados durante a anoikis (VALENTIJN, ZOUQ & GILMORE, 2004). Anoikis tem sido associada com a ativação da via extrínseca da apoptose, que nas células endoteliais provavelmente ocorre através do mecanismo de ativação do receptor Fas, também conhecido como CD95 (DÍAZ, et al, 2005).

2.9 INTEGRINAS

As integrinas são uma família de macromoléculas mediadoras da adesão celular e reguladoras da angiogênese e da homeostasia vascular. Fornecem interação física com a matriz extracelular necessária para a adesão, migração e posicionamento celular e induzem

eventos sinalizadores essenciais para a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (BAPTISTA, 2005). As integrinas são glicoproteínas transmembranas heterodiméricas, consistindo de duas subunidades α (150 a 180 KD) e β (~90 KD), associadas não-covalentemente. Atualmente, são conhecidos dezoito tipos de subunidades α e oito tipos de subunidades β que, combinadas, constituem pelo menos 24 integrinas já descritas (XIONG et al., 2001; TUCKER, 2002). O contato entre as subunidades α e β envolve suas metades amino-terminais que, juntas, formam uma “cabeça” globular e as porções remanescentes formam duas caudas em formato cilíndrico que transpassam a membrana plasmática. Ambas subunidades α e β apresentam um pequeno domínio transmembrana (20 a 30 resíduos) e uma região intracelular (20 a 50 resíduos) (SILVA et al, 2007).

Existem duas séries principais de integrinas, aquelas onde a subunidade α contém uma região extra de aproximadamente 180 aminoácidos, o domínio α -A e aquelas que não têm (FIG.11). O domínio α -A é formado por um conjunto de aminoácidos próximos à função amino-terminal, capaz de se ligar a cátions bivalentes, como Ca^{2+} ou Mg^{2+} , representando o sítio de adesão dependente de íon metálico - MIDAS. A subunidade β também possui um domínio tipo-A, o domínio β -A. Para integrinas com dois domínios A, o domínio α -A é que participa da ligação com o ligante e pouco se sabe da função do domínio β -A. Para as integrinas que possuem apenas o domínio β -A, este é responsável pela ligação com o ligante (SILVA et al, 2007).

TABELA 2 - Subunidades de integrina e seus ligantes

Subunidade β	Subunidade α	Ligante
β_1	α_1	Lm, Col
	α_2	Col, Lm, $\alpha_3\beta_1$
	α_3	Fn, Lm, Col, Epi, ENT, $\alpha_2\beta_1$
	α_4	Fn, (EILDV), VCAM α_4
	α_5	Fn (RGDS)
	α_6	LM, Ka, Epi
	α_7	Lm
	α_8	Osteopontin
	α_9	LM, Tem, VCAM-1
	α_V	Fn, Vn
β_2 (CD18)	α_L (LFA, CD11a)	ICAM
	α_M (Mac1, CD11b)	ICB3, Fb, FX
β_3	α_X (P150, 95, CD11c)	ICB3
	α_{IIb} (GPIIb)	Fb, VWF, Fn, Vn, TSP
	α_V (VNR)	Vn, VWF, Fn, Fg, TSP, Te
β_4	α_6	LM, Ka
β_5	α_V	Vn
β_5	α_V	Fn
β_7	α_4	Fn (EILDV), VCAM
	α_E	Caderina
β_8	α_V	Vn

Abreviações: LM-Laminina; Col; Colágeno; Vn-Vitronectina; Fibrinogênio; VWF- Fator Von Willebrand; FX- Fator X; ICAM-Molécula de Adesão Celular; VCAM-Molécula de Adesão Vasucular; KA-Kalanin; EPI-Epigrilin; ENT-Enctatin; OST-Osteopontin; TE-Tenascin; RGDS-Arg-Gly-Asp-Ser; EILDV- Glu-Ile-Leu-Asp-Val; IC3B sistema do do complemento (PETRUZZELL et al, 1999).

Recentemente foi demonstrado que as células normais precisam se aderir aos componentes MEC como: fibronectina, colágeno, laminina e vitronectina, para proliferação *in vitro*. A perda deste requisito é uma marca de células neoplásicas e representa talvez a melhor correlação com a tumorigênese *in vivo*. Estes resultados levaram à hipótese de que a MEC gera sinais necessários para a progressão de células normais durante o ciclo celular. Estudos

posteriores demonstraram que integrinas podem cooperar com receptores de fatores de crescimento e produzir um estímulo sinérgico de uma ou mais vias de sinalização mitogênica. No entanto, esse mecanismo não é bem conhecido (GIOACOTTI, 1997).

As integrinas podem mediar a sinalização por dois mecanismos, chamados *inside out* ("de dentro para fora") e de sinalização *outside in* ("de fora para dentro") (FIG. 12). A sinalização *inside out* é o mecanismo pelo qual uma célula regula o estado da sua afinidade com as integrinas receptoras. Acredita-se que neste processo ocorra a propagação de alterações conformacionais a partir dos domínios citoplasmáticos das integrinas para os sítios de ligação extracelular, em resposta aos eventos de sinalização intracelular. Há evidências de que as mudanças conformacionais dentro das regiões das subunidades α e β sejam provocadas por eventos de fosforilação ou desfosforilação que permitem a associação com outras proteínas que regulam o estado de ativação das integrinas (JONES & WALKER, 1999).

A sinalização *outside in*, ocorre através de sinais provenientes da matriz extracelular após a ligação das integrinas à MEC. Os domínios das subunidades α e β conectam-se a filamentos de actina do citoesqueleto por meio das proteínas intracelulares como talina, vinculina, actinina, tensina, quinase de adesão focal (FAK), etc., e este processo atua na regulação e organização do citoesqueleto, ativando uma cascata de quinases sinalizadoras que modulam o ciclo celular (HAUBNER, FINSINGER & KESSLER, 1997). Este processo é dependente de GTPase Rho A. FAK fosforilada também pode levar à ativação da proteína quinase mitogênica ativada (MAP), provavelmente via ativação de Ras, que pode influenciar a expressão gênica (JONES & WALKER, 1999).

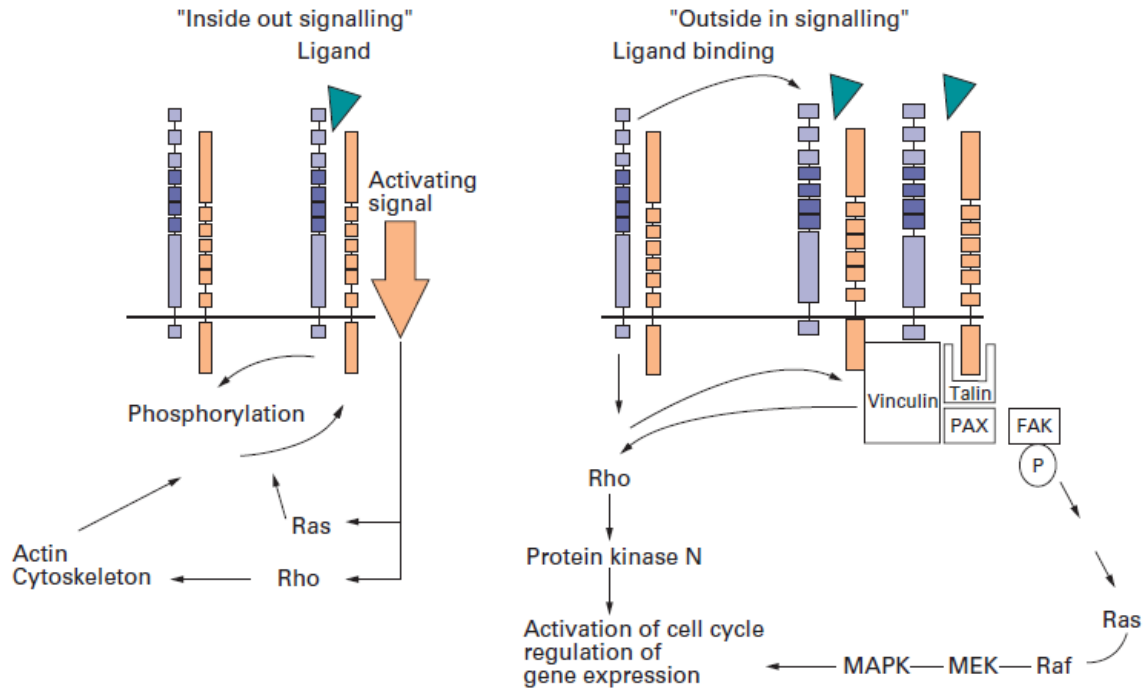


FIGURA 12 - Mecanismo de sinalização mediado por integrinas (JONES & WALKER, 1999).

O evento chave para a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S é a hiperfosforilação da proteína retinoblastoma (Rb). A fosforilação da Rb é controlada por ciclinas D, sendo que estas proteínas são reguladas por fatores mitogênicos de crescimento e quinases dependentes de ciclinas (JONES & WALKER, 1999).

A indução da transcrição da ciclina D é frequentemente associada à ativação do fator ERK. Na maioria dos casos a ativação de Ras-Raf-MEK-ERK e do fator FAK induz uma cascata de eventos que resultam na expressão gênica da ciclina D1. Muitos estudos mostram que a ativação da ciclina D1 requer atividade moderada de ERK, mas esta atividade tem que ser mantida por várias horas. Alguns estudos também têm demonstrado que a fosforilação dependente de integrina do fator FAK possui um papel importantíssimo na fosforilação do ERK (FIG.13) (SHCWARTZ & ASSOIAN, 2001).

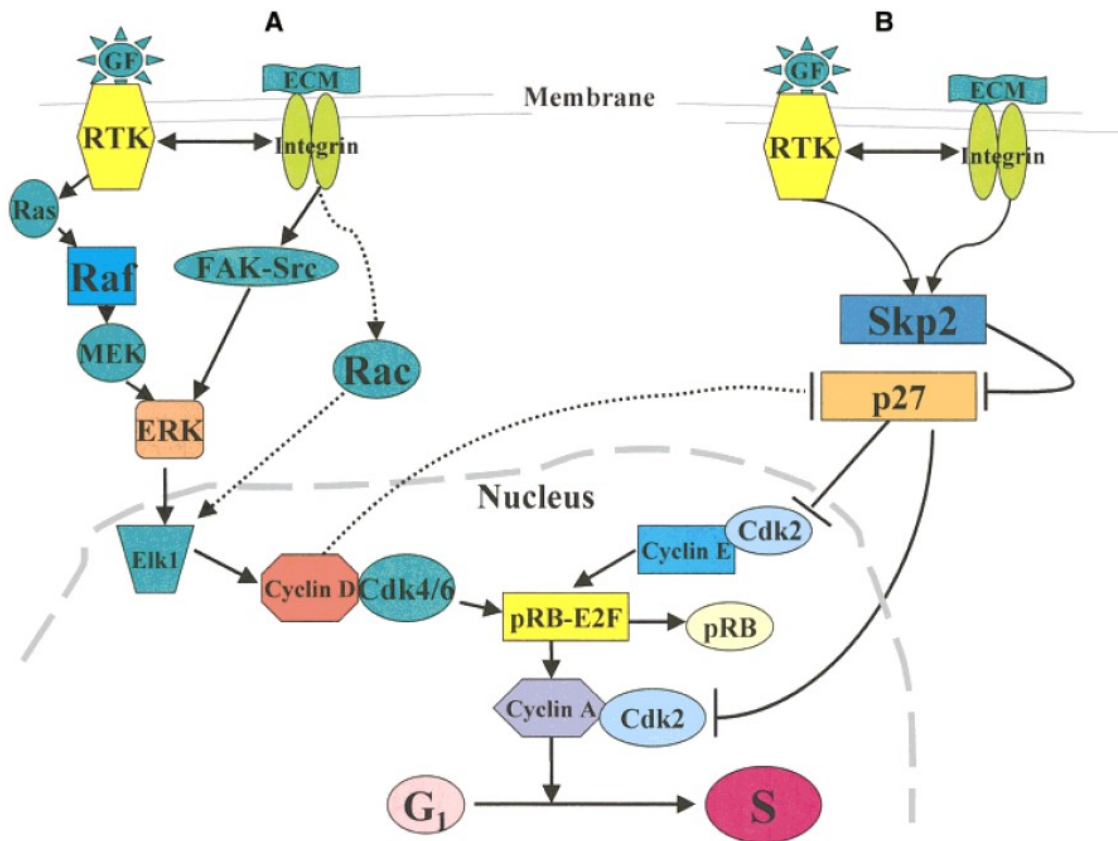


FIGURA 13 – Indução da transcrição de ciclina D1 a partir da ativação de ERK (PU & STREULI, 2002).

Como dito anteriormente, as integrinas participam dos processos centrais de ancoragem, crescimento, apoptose, diferenciação, e migração celular, e tais processos são drasticamente desregulados nas células tumorais. Portanto, não é surpreendente a atenção que se centrou sobre o envolvimento potencial da expressão de integrinas alteradas em tumores (JONES & WALKER, 1999).

A formação de novos vasos (angiogênese) a partir de células endoteliais é essencial para o desenvolvimento de órgãos, cicatrização de ferimentos, nos processos inflamatórios e na tumorigênese. A angiogênese e a metástase tumoral são processos funcionalmente relacionados, pois ambos envolvem uma tríade de eventos fisiopatológicos como: mobilidade celular, proteólise tecidual e proliferação celular (LIOTTA, STEEG & STELLER-STEVENSON, 1991). O processo de angiogênese envolve uma série de etapas (FIG.14).

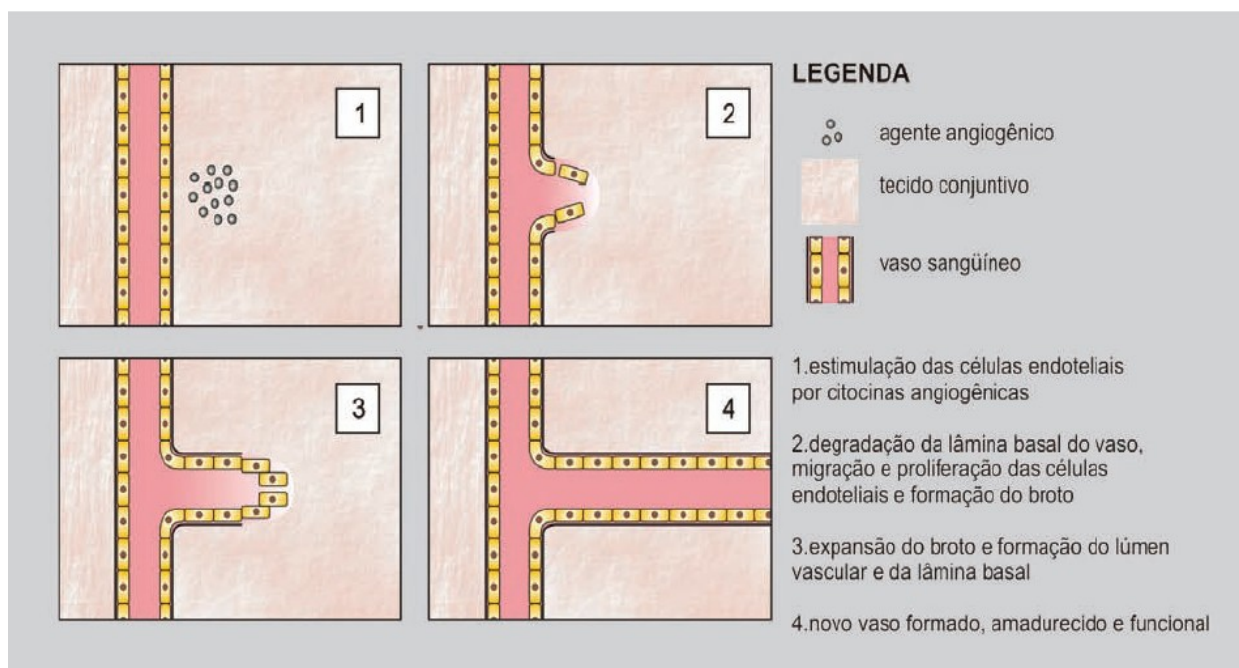


FIGURA 14 – Representação esquemática da angiogênese (SILVA et al, 2007).

Os eventos adesivos requeridos na angiogênese são rigorosamente regulados e ativados por um curto período de tempo (alguns dias) e, logo após, suprimidos completamente. No endotélio em “repouso” (sem atividade angiogênica), a integrina $\alpha_v\beta_3$ praticamente não é detectada. Na angiogênese induzida por citocinas ou por tumores, entretanto, sua expressão é intensamente estimulada (SILVA et al, 2007). A falta de interações célula-matriz induz um sinal apoptótico nas células endoteliais envolvidas na angiogênese e, portanto, previne a neovascularização. Em vários modelos animais, foi demonstrado que antagonistas de integrinas bloqueiam a angiogênese induzida por fatores de crescimento tumoral.

Durante o remodelamento vascular e a angiogênese, as células endoteliais aumentam a expressão de vários constituintes da sua superfície que potencializam a invasão e proliferação celular, dentre elas a integrina $\alpha_v\beta_3$. Além de exercer um papel importante na angiogênese em diferentes níveis da metástase tumoral, a integrina $\alpha_v\beta_3$ atua na fagocitose de células em apoptose, no remodelamento ósseo e na falência renal aguda. Possui afinidade por inúmeras proteínas adesivas como vitronectina, fibronectina, fibrinogênio, laminina, colágeno, fator de von Willebrand, colágeno tipo I e osteopondina (SILVA et al, 2007; DWAYNE et al, 2002).

A distribuição das integrinas é amplamente difundida em todos os tecidos e células (TAB.3). Durante o desenvolvimento as integrinas são muito expressas, mas tendem a diminuir sua expressão durante a diferenciação (MIZEJEWSKI, 1999).

TABELA 3 - Membros da família de supergenes das integrinas organizadas de acordo com o receptor, designação, componentes estruturais e distribuição celular.

Integrina	Nome original do receptor	Designação	Distribuição célula/tecido
$\alpha_1\beta_1$	VLA-1	CD49a; CD29	Músculo liso, Linfócito T, endotélio hepatócito
$\alpha_2\beta_1$	VLA-2 (plaquetas 6P la	CD49b; CD29	Epitélio, endotélio, leucócitos plaquetas
$\alpha_3\beta_1$	VLA-3	CD49c; CD29	Epitélio, endotélio,
$\alpha_4\beta_1$	VLA -4	CD49d; CD29	Leucócitos, melanomas
$\alpha_5\beta_1$	VLA-5 (plaquetas GPIc	CD49e; CD29	Endotélio, plaquetas, hepatócitos, linfócitos
$\alpha_6\beta_1$	VLA-6	CD49f; CD29	Maioria das células, plaquetas, epitélio, endotélio
$\alpha_7\beta_1$	VLA-7	NR	Músculo, melanoma
$\alpha_8\beta_1$	VLA-8	NR	Epitélio, cérebro, endotélio
$\alpha_v\beta_1$	VNR	NR51; CD29	Fibroblasto, células tumorais, osteoblastos
$\alpha_L\beta_2$	LFA-1	CD11a; CD18	Leucócito, células mielóides
$\alpha_m\beta_2$	MAC-1	CD11b; CD18	Linfócito, neutrófilo, monócito
$\alpha_x\beta_2$	P150.95	CD11c; CD18	Granulócitos, monócitos
$\alpha_{11b}\beta_{3a}$	Receptor de plaqueta	CD41; CD61	Megacariócitos, plaquetas, melanoma
$\alpha_v\beta_{3a}$	Plaqueta IIIA, receptor VN	CD51; CD61	Osteoclasto, tumores, endotélio, fibroblatos
$\alpha_6\beta_4$	VLA6 _{alt}	CD49f; CD104	Neurônios, fibroblastos, epitélio
$\alpha_5\beta_5$	VNR _{alt}	CD51;CD19	Pâncreas, fibroblatos, carcinomas
$\alpha_v\beta_6$	VNR β	CD51; CD61	Epitélio, carcinomas

NR = Não relatado (adaptado de MIZEJEWSKI, 1999).

A família das integrinas β_3 (CD61) consiste dos receptores: $\alpha_{11b}\beta_3$ (CD41/CD61), encontrado em plaquetas e megacariócitos, e $\alpha_v\beta_3$ (CD51/CD61), que está mais amplamente distribuído em outros órgãos e tecidos. A integrina $\alpha_{11b}\beta_3$ possui afinidade maior pelo fibrinogênio e está envolvida nos mecanismos de hemostasia (ERB et al, 1997; XUE et al, 1997) e o bloqueio da agregação plaquetária pelos antagonistas da integrina $\alpha_{11b}\beta_3$ constitui uma importante estratégia terapêutica (XUE et al, 1997). Além disso, a integrina $\alpha_{11b}\beta_3$

também é expressa em certos tipos de tumores (HAUBNER, FINSINGER & KESSLER, 1997).

2.10 A SEQUÊNCIA RGD

As proteínas adesivas, embora estruturalmente diferentes, requerem seqüências de reconhecimento aproximadamente semelhantes para se ligarem às integrinas. Essas proteínas possuem em comum um resíduo de ácido aspártico ou de ácido glutâmico exposto, geralmente, em dobras estendidas e flexíveis. Das seqüências de aminoácidos que contêm ácido aspártico capazes de se ligarem às integrinas, a mais freqüente e mais estudada delas é a seqüência *arginina – glicina – ácido aspártico* (*Arg-Gly-Asp* ou *RGD*) (FIG.15), também conhecida como “*sítio universal de reconhecimento celular*” (HAUBNER, FINSINGER & KESSLER, 1997; XIONG et al, 2002). Entretanto, outras seqüências também podem ser reconhecidas pelas integrinas, tais como ECD.

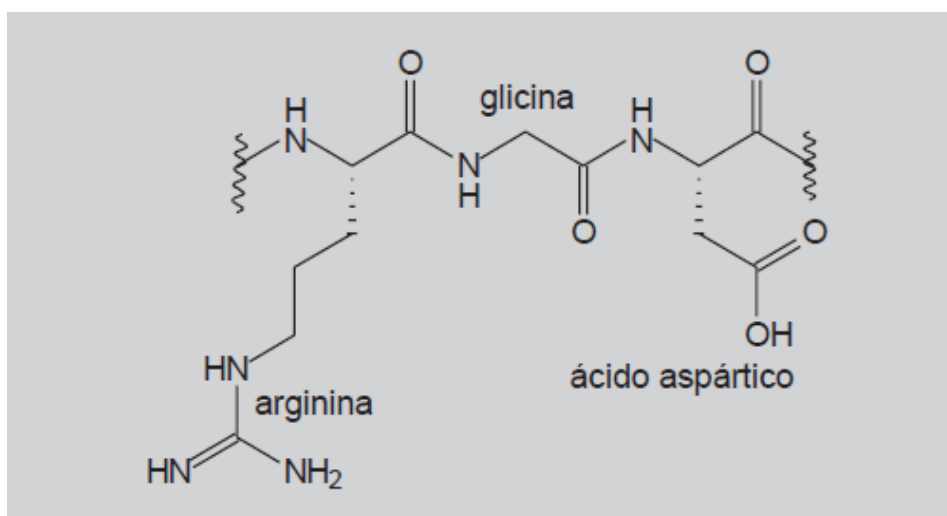


FIGURA 15 - A seqüência tripeptídica RGD (SILVA et al, 2007).

Várias proteínas adesivas, como laminina, fibronectina, vitronectina, fibrinogênio e colágeno, contêm a seqüência RGD e podem ter sua interação com as integrinas inibida por antagonistas desses ligantes denominados genericamente antagonistas da seqüência RGD ou, também, antagonistas de integrinas. A seletividade dessas proteínas adesivas às várias integrinas é bastante diversa. Este fato pode ser explicado pela existência de sítios de ligação adicionais e pelas diferentes conformações que a seqüência RGD pode apresentar nas diferentes estruturas protéicas (HAUBNER, FINSINGER & KESSLER, 1997). O motivo

RGD/ECD é encontrado em alguns venenos de serpente, as chamadas desintegrinas, que podem se ligar às integrinas, presentes na membrana de células normais e tumorais, e interferir nos processos de adesão mediada por integrinas (HAUBNER, FINSINGER & KESSLER, 1997).

2.11 RECEPTOR ATIVADO POR PROTEASE (PAR)

Um evento crítico no desenvolvimento de tumores malignos é a aquisição da capacidade de atravessar a membrana basal, entrar no sistema circulatório e estabelecer metástases em sítios distantes do local de origem. Este mecanismo de invasão pode ser desencadeado por Receptores Ativados por Proteases (PARs).

Receptores Ativados por Proteases (PARs) são uma família de receptores com domínio transmembrana que são ativados por clivagem proteolítica específica do seu domínio N terminal extracelular. Esta clivagem lança um novo motivo de aminoácidos na cauda N terminal que então se liga ao receptor como um agonista para induzir um sinal intracelular (FIG.16) (VERGNOLLE, 2005).

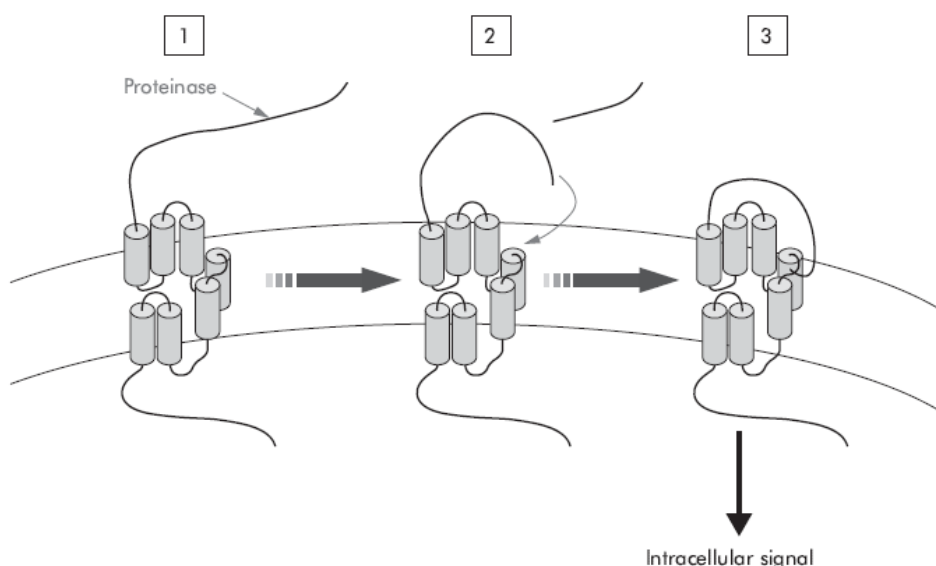


FIGURA 16 – Mecanismo de ativação do receptor ativado por protease. Proteinases clivam o domínio N terminal (1) liberando o novo N terminal, que age como um ligante que se liga ao próprio receptor (2) para induzir uma cascata de sinais intracelulares (3) (VERGNOLLE, 2005).

Foram descritos até hoje quatro membros da família do PAR: PAR-1, PAR-2, PAR-3 e PAR-4. Cada um destes receptores pode ser ativado pela mesma proteinase, por exemplo, a trombina pode ativar PAR-1, PAR-3 e PAR-4, e a tripsina pode ativar PAR-2, PAR-4, e, em menor extensão o PAR-1 e o PAR-3, ou eles podem ser ativados por proteinases diferentes: por exemplo, a triptase ativa somente PAR-2 (LAKSHMI et al, 2001).

A trombina foi originalmente identificada como um mediador chave da cascata de coagulação e um potente ativador de agregação plaquetária. É agora bem estabelecido que a trombina é um ativador fisiológico do PAR-1, 3 e 4. A ativação PAR é conhecida por desempenhar um papel importante nos processos de agregação plaquetária, vasodilatação e vasoconstrição, aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia de granulócitos e eventos inflamatórios do trato gastrointestinal. Vários estudos também têm demonstrado que a ativação do PAR-1 pela trombina induz ou inibe apoptose em neurônios e astrócitos cultivados bem como em células tumorais (FLYNN & BURET, 2004).

Os receptores PARs estão presentes em células endoteliais, plaquetas e outros tecidos (TAB.4).

TABELA 4 - Expressão de PAR em diversos órgãos

PAR -1	PAR -2	PAR -3	PAR -4
Cérebro	Intestino	Coração	Pulmão
Coração	Rins	Rins	Intestino
Pulmão	Fígado	Intestino	Osso
Rins	Pâncreas	Estômago	Músculo
Estomago	Músculo		

Baseado em Vergnolle, 2005

A descoberta dessa família de receptores merece destaque e abriu o horizonte para uma nova maneira de pensar sobre o papel das proteinases, que não pode ser visto apenas como enzimas de degradação, mas que podem direta e especificamente agir no mecanismo de envio de sinais às células (VERGNOLLE, 2005).

Receptores PARs, especialmente PAR-1 e PAR-2, estão envolvidos em diversos processos carcinogênicos. A expressão do PAR-2 tem sido observada em câncer de pulmão, fígado, próstata, tireóide, mama, cólon, pâncreas, vesícula biliar, melanoma e glioblastoma (JAHAN et al, 2007), já a expressão do PAR-1 tem sido associada com a indução de metástase. A expressão do PAR-1 em câncer de mama correlaciona-se com a progressão do tumor e em câncer de próstata, induz metástase óssea. Células metastáticas de melanoma humano também expressam PAR-1 e em carcinoma de cólon a trombina estimula a motilidade das células em processos dependente de PAR-1 (SHI et al, 2004). A ativação do PAR-1 também afeta a distribuição de integrinas na superfície celular, sem alterar seus níveis de expressão. Este receptor então se associa com a integrina $\alpha_v\beta_5$, induzindo a reorganização do citoesqueleto e formação do complexo de adesão focal, que levam as células tumorais a invadirem outros tecidos (YIN et al, 2003).

2.12 TOXINAS PRESENTES NA PEÇONHA DAS SERPENTES

O veneno das serpentes peçonhentas é composto de substâncias simples e complexas, cuja proporção e características próprias variam entre as diferentes espécies conhecidas (TU, 1977). A toxicidade do veneno deve-se à presença de proteínas e peptídeos, e sua ação letal é atribuída principalmente às toxinas e/ou à ação sinérgica dos seus princípios ativos. Peçonhas da família Viperidae são particularmente ricas fontes de metaloproteases (SVMPs) e serino proteases. Estas enzimas afetam vários processos fisiológicos, incluindo a cascata de coagulação, fibrinólise, função plaquetária, permeabilidade vascular e pressão sanguínea (MATSUI et al, 2000; BRAUD et al, 2000, MARKLAND, 1998). Algumas destas proteases já foram bem caracterizadas por interferir no processo de adesão celular, o qual é mediado por uma série de proteínas presentes na matriz extracelular (HYNES, 1992).

As metaloproteases (SVMPs) representam alguns dos componentes tóxicos dos venenos. Estas proteases são zinco endopeptidases e pertencem à superfamília das metzincinas (Stocker, et al, 1995; Bjarnason & Fox, 1995). As SVMPs compartilham um alto grau de homologia estrutural e são organizadas em classes, P-I, P-II P-III e P-IV (SANCHEZ & SWENSON, 2007). A classe P-I consiste apenas do domínio de metaloprotease, que é composto de 200-204 resíduos de aminoácidos (Mr~23 kDa). Estas proteínas podem ter pouca ou nenhuma atividade hemorrágica. A classe P-II (precursora de desintegrina) tem um domínio desintegrina adicional ao carboxiterminal do domínio de protease. A classe P-III

(Mr, ~55 kDa) apresenta o domínio similar a desintegrina (ECD no lugar de RGD), seguido de um domínio rico em cisteína. Estas metaloproteinases são fortemente hemorrágicas, capazes de induzir uma lesão hemorrágica de 10 mm com doses na ordem nano ou micromolar. A classe P-IV apresenta um domínio adicional de lectina no carboxiterminal da molécula (WANG, SHIH & HUANG, 2004).

Apesar de efeitos tóxicos, alguns componentes da peçonha de serpentes têm apresentado importantes efeitos inibitórios do crescimento tumoral e metástase. Um componente responsável por estes efeitos são as metaloproteases/desintegrinas (CORREA et al, 2002).

O termo desintegrina foi usado pela primeira vez em 1989 para descrever moléculas pequenas de peso molecular em torno de 5-9 kDa. Estes peptídeos são ricos em cisteína e são capazes de interagir com componentes da superfície celular (DENNIS et al, 1989; GOULD et al, 1990; NIEWIAROWISK et al. 1994; McLANE et al, 1998; HUAG, 1998).

Com base nas características estruturais, as desintegrinas foram classificadas em cinco grupos de acordo com o tamanho da cadeia polipeptídica e o número de pontes dissulfeto em sua estrutura. No grupo 1 estão as desintegrinas pequenas formadas por apenas 49-51 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto, dentro desse grupo está a echistatina e a eristostatina, entre outras (CALVETE et al, 1992; BAUER et al, 1993, McLANE et al, 1996, CALVETE et al, 2003). O grupo 2 é composto pelas desintegrinas de tamanho médio com aproximadamente 70 aminoácidos e seis pontes dissulfeto, as mesmas são derivadas das metaloproteases de classe P-II. A maioria das desintegrinas pertence a este grupo e possui a seqüência RGD. As desintegrinas com cerca de 80 aminoácidos pertencem ao grupo 3 e possuem 7 pontes dissulfeto. No grupo 4 estão as desintegrinas-*like* e são derivadas das metaloproteases de classe P-III. Estas proteínas são formadas por 100 resíduos de aminoácidos com 16 sítios de cisteínas que estão envolvidas na formação de oito pontes dissulfeto (KINI & EVANS, 1992; JIA et al, 1996; McLANE et al, 1998; CALVETE et al., 2000; CALVETE, et al, 2003). O Grupo 5 compreende as desintegrinas diméricas e homodimérica. As desintegrinas diméricas, como a contortostatina, contêm subunidades de aproximadamente 67 resíduos com dez cisteínas envolvidas na formação de quatro pontes de dissulfeto intracadeia e duas pontes dissulfeto intercadeias. A Bilitoxina-1 representa uma

desintegrina homodimérica constituída de 15 resíduos de cisteína. (TRIKHA et al, 1994, CALVETE, 2003).

As desintegrinas são capazes de se ligar às integrinas presentes na membrana de células normais e tumorais e de interferir de inúmeras maneiras em sua função. Estas moléculas foram originalmente descritas em venenos de serpentes como potentes inibidores da agregação plaquetária (NIEWIAROWSKI et al, 1994). Por exibir um alto grau de diversidade de seqüências em seus sítios de ligação às integrinas, estas desintegrinas são capazes de inibir a adesão de células normais ou tumorais.

Há muitos anos sabe-se que a administração de peptídeos sintéticos solúveis que contêm a seqüência RGD inibe a formação de metástase. Contudo, o efeito na inibição da formação de metástases promovido por desintegrinas contendo a seqüência RGD é muitas vezes mais potente que o efeito dos peptídeos RGD sintéticos. Isto se deve provavelmente a complexidade estrutural destas proteínas, visto que resíduos adjacentes à seqüência adesiva RGD e a própria estrutura tridimensional das desintegrinas têm se mostrado importantes para a ligação aos seus ligantes específicos. Assim, o estudo das desintegrinas presentes no veneno de serpentes é extremamente importante na busca de ferramentas para terapia antitumorais. Mais recentemente tem sido demonstrado que peptídeos contendo a seqüência RGD podem ser radiomarcados com emissores gama ou pósitrons e aplicados para diagnóstico diferencial de tumores (CHEN et al, 2006).

O processo de invasão e metástase envolve uma complexa cascata de eventos adesivos. As células tumorais apresentam uma série de alterações que interferem nos processos de adesão celular e interação com a matriz extracelular, sendo que a adesão mediada por integrinas é fundamental para disseminação do câncer. As células tumorais apresentam na sua superfície alteração na expressão das integrinas e/ou outras moléculas relacionadas com o processo de adesão (VAN WAES, 1995). Estudos recentes mostram que desintegrinas-RGD são capazes de inibir a adesão celular de células cancerosas à matriz extracelular por competir com receptores específicos de integrina. Além disso, estas proteases também inibem a proliferação metastática. A salmosina (*Agkistrodon halys brevicaudus*), uma desintegrina – RGD, reduziu significativamente o número de metástases *in vivo* da linhagem B16F10 de melanoma e induziu a desadesão de células do endotélio capilar bovino e sua

apoptose através da interação com a integrina $\alpha_2\beta_1$ (HONGA et al, 2003). A eristostatina inibiu em 87% a metástase pulmonar em camundongos (DANEN et al, 1998).

As desintegrinas-*like*, assim como as desintegrinas-RGD, também são inibidoras da agregação plaquetária (USAMI et al, 1994; JIA et al, 1997; SHIMOKAWA et al, 1997). Estas proteases também são capazes de se ligarem às integrinas da superfície celular de várias linhagens celulares e inibir a adesão aos seus ligantes naturais. A jararagina (*Bothrops jararaca*) inibe a adesão de células transfectadas com a integrina $\alpha_2\beta_1$ e de células ECV304 e HUVEC ao colágeno tipo 1. Em concentrações muito maiores a jararagina também inibe a adesão de linhagens celulares que expressam as integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, aos seus respectivos ligantes naturais (MOURA-DA-SILVA et al, 2001).

O interesse na radiomarcagem de moléculas que possam ser utilizadas na oncologia tem crescido muito nos últimos anos, principalmente dos peptídeos que contêm a seqüência RGD.

Diversas desintegrinas de venenos de serpentes têm sido descritas como inibidoras de adesão de células cancerosas, migração, crescimento tumoral e desenvolvimento de metástases em modelos animais (SHEU, LIN & HUANG, 1994). Segundo Haubner (2006), peptídeos contendo a seqüência – RGD, após serem marcados com ^{111}In , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I , ^{64}Cu , e ^{18}F , apresentaram alta afinidade *in vitro* pela integrina $\alpha_v\beta_3$ e *in vivo* os resultados mostraram inibição da proliferação celular e diminuição de metástases.

2.13 A ESPÉCIE *Bothrops leucurus*

Membros do gênero *Bothrops* ocupam vários habitats e alguns têm se tornado importantes agentes de envenenamento em humanos devido à sua abundância em regiões cultiváveis (GREENE, 1997). Em nosso meio, o gênero possui algumas das espécies de maior importância em saúde pública (*Bothrops jararaca*, *B. leucurus*, *B. atrox*, *B. moojeni*, *B. jararacussu*, dentre outras), já que são responsáveis por 73% dos acidentes ofídicos anuais que o Brasil registra. Baseados em dados do Ministério da Saúde, a letalidade dos acidentes botrópicos não tratados está em torno de 0,3% (CARDOSO, 2003).

O presente trabalho é parte de estudos relacionados com as toxinas da peçonha da serpente *Bothrops leucurus* (jararaca-do-rabo-branco) que é o viperídeo mais comum na faixa atlântica (Zona da Mata) do Nordeste, desde a Paraíba até o norte do Espírito Santo (FIG. 17), onde se torna difícil distingui-la de outra espécie descrita para este local, *Bothrops pradoi*. Nestas regiões, que inclui a região metropolitana da cidade de Salvador, *B. leucurus* é a principal espécie responsável pelos acidentes ofídicos em humanos. *B. leucurus* apresenta grande importância por habitar as regiões mais densamente povoadas pelo homem, tanto nas áreas urbanas e periurbanas quanto rurais. É uma espécie de porte avantajado, podendo medir até 1,7 m de comprimento e é bastante prolífera (CARDOSO, 2003).

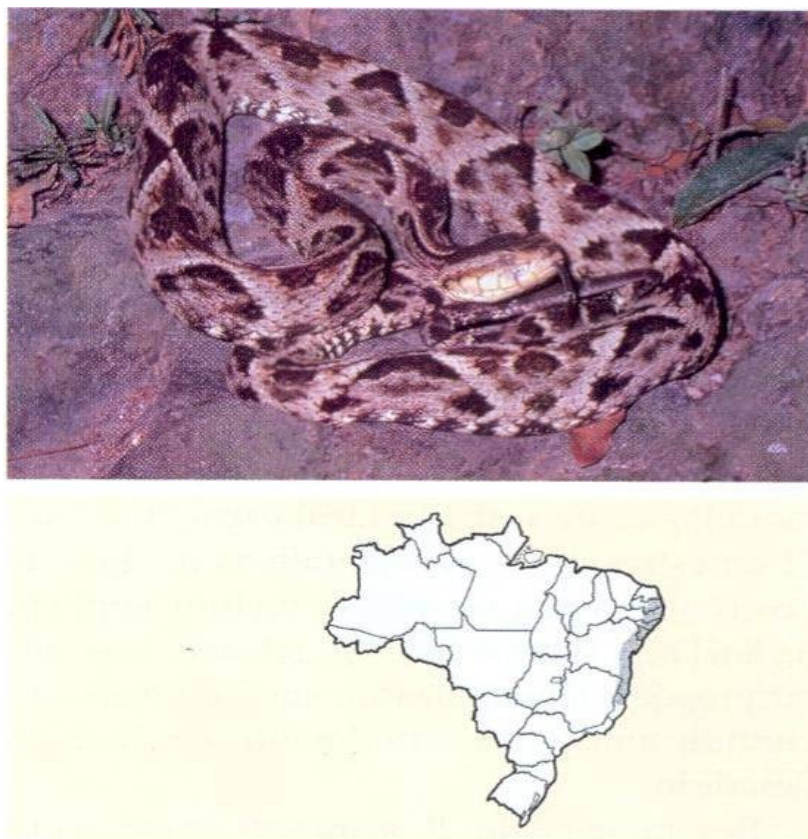


FIGURA 17 - *Bothrops leucurus* e sua distribuição geográfica. Fêmea adulta do município de Quebrângulo, Estado de Alagoas. (CARDOSO, 2003).

Devido a sua distribuição mais restrita, o veneno de *Bothrops leucurus* é pouco estudado e o seu potencial biotecnológico como antitumoral permanece inexplorado. Recentemente, Sanchez et al (2007) isolaram deste veneno a Leucurolisina B (Leuc- B), uma metaloprotease (SVMP) de classe III de ~ 55 kDa com domínio **HEXXHXXGXXH**, capaz

de inibir o efeito do colágeno em ensaios *in vitro* de agregação plaquetária. Trata-se de uma glicoproteína multimodular composta pelo domínio metaloprotease, domínio similar à desintegrina (ECD) e rico em cisteína (SANCHEZ et al, 2007). Leuc-B pode atuar sobre diversas moléculas da matriz extracelular, resultando na perda de adesão da mesma ao seu substrato, alterando sua morfologia. Os resultados também mostram atividades proteolíticas dessa metaloproteinase em diversas moléculas da matriz extracelular, resultando na perda de adesão da mesma ao seu substrato, alterando, assim, sua morfologia. Observa-se uma potente atividade α -fibrinogenase, apresentando também uma pequena atividade degradatória sobre a cadeia β do fibrinogênio (SANCHEZ et al, 2007).

3 JUSTIFICATIVA

Em 2008, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes. Do total de óbitos por câncer ocorridos em 2008, mais de 70% ocorreram em países de média ou baixa renda (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). Estima-se que em 2020 o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões, sendo que cerca de 60% desses novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento como o Brasil (INCA, 2010).

O conhecimento sobre as neoplasias tem crescido bastante mas, no entanto, poucos avanços no diagnóstico e na terapia foram obtidos. Diante de tal cenário, fica clara a necessidade do desenvolvimento de novas substâncias que apresentem baixa toxicidade para o organismo, que possam ser utilizadas tanto para o diagnóstico como no tratamento das neoplasias.

As toxinas de origem natural têm fascinado o homem há muito tempo, devido aos seus efeitos farmacológicos, sistêmicos e neuroquímicos. Pesquisas no campo de toxinas de origem animal têm contribuído muito na compreensão, por exemplo, dos problemas vasculares, processos inflamatórios, mecanismos de dor, processos alérgicos e asma bronquial, entre outros.

Fármacos importantes foram isolados de produtos naturais, desde microorganismos, como no caso da penicilina (LIGON BL, 2004), passando por vegetais (vimblastina, NOBLE RL, 1990) até animais marinhos (ziconotídio, WERMELING DP, 2005) e terrestres (captopril) (LEWIS & GARCIA, 2003). Entre os moluscos marinhos, destacam-se as espécies de *Conus* que produzem uma série de peptídeos neurotóxicos, sendo que alguns deles estão em utilização como modelos para o desenvolvimento de drogas anti-convulsivas. Dos venenos de aranhas, várias neurotoxinas que bloqueiam os canais de cálcio têm sido alvo de interesse biotecnológico. Entre os escorpiões uma toxina peptídica, margarotoxina, foi utilizada como droga-líder para o desenvolvimento de um imunossupressor potencialmente útil para a terapia de doenças autoimunes e na prevenção de rejeição de órgãos transplantados (PALMA, YAMANE & CAMARGO, 2001).

As peçonhas de serpentes também são reconhecidas fontes de substâncias bioativas. Estas substâncias possibilitaram a descoberta de fármacos potentes, como é o caso da descoberta da bradicinina por Rocha e Silva et al, (1949) e do fator potenciador de bradicinina (FERREIRA, 1965), que levaram ao desenvolvimento do fármaco comercial captopril, um dos anti-hipertensivos mais utilizados atualmente. Recentemente, a metaloproteínaase alfineprase (r-fibrolase) isolada do veneno de *Agkistrodon contortrix contortrix* tem sido utilizada no tratamento de trombose em estudos pré-clínicos (MOLL et al, 2006; HONG et al, 2006). Similarmente, em estudos realizados com mutalisina-II, uma metaloprotease classe P-I, 22 kDa do veneno de *Lachesis muta muta* foi demonstrado efeito trombolítico em modelos *in vivo* (AGERO et al, 2007).

Também para a biologia do câncer diferentes classes de substâncias presentes na peçonha de serpentes com possíveis aplicações terapêuticas vêm sendo descobertas. Dentre estas classes talvez a mais promissora seja os inibidores de integrinas, também chamados de desintegrinas. Um trabalho recentemente publicado descreve o isolamento de uma desintegrina do veneno de *Bothrops alternatus* com alta afinidade pela integrina $\alpha_v\beta_3$ e capaz de inibir a angiogênese induzida por EGF e diminuir significativamente o número de células metastáticas no pulmão de modelos animais de melanoma (OH et al, 2008). Utilizando modelo experimental semelhante foi demonstrado que as desintegrinas jarastatina (*Bothrops jararaca*), flavoridina (*Trimeresurus flavoviridis*) e kistrina (*Calloselasma rhodostoma*) também inibiram a colonização pulmonar por células metastáticas de melanoma. Além disso, a jarastatina e a flavoridina também inibiram a proliferação de células de melanoma *in vitro* (OLIVIA et al, 2007).

Certamente os avanços nas investigações sobre a constituição bioquímica da peçonha de serpentes conduzirão a descobertas promissoras para a terapia contra o câncer, assim como para o diagnóstico de tumores, já que não há no mercado um radiofármaco seletivo para detecção de sítios tumorais.

Assim, tendo em vista o grande potencial biotecnológico dos componentes de peçonhas de serpentes, o trabalho em questão apresenta-se como uma proposta promissora na busca de um novo fármaco e/ou radiofármaco mais específico para aplicação no diagnóstico e no tratamento de tumores.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

Tendo em vista o envolvimento de atividades enzimáticas do tipo protease (metaloprotease/desintegrina) no processo de adesão, bem como proliferação e morte celular, neste projeto será avaliado o potencial biotecnológico da peçonha de *B. leucurus* e da Leuc-B, isolada dessa peçonha para o desenvolvimento de fármacos e radiofármacos antitumorais.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o efeito antitumoral da peçonha de *Bothrops leucurus* (PBL) através da avaliação de sua citotoxicidade em linhagens de células de glioblastoma (RT2, T98, U87), carcinoma mamário (MCF7), carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE) e melanoma (UACC).
- Analisar a toxicidade da Leuc-B isolada da PBL em linhagem de células de glioblastoma (U87, RT2, e T98), em carcinoma mamário (MCF7), em carcinoma ascítico de Ehrlich (CAE) e UACC (melanoma).
- Avaliar a inibição proliferativa da Leuc-B isolada da PBL em linhagens de células tumorais.
- Avaliar a alteração do DNA cromossomal induzido pela Leuc-B através da coloração com DAPI e laranja de acridina/brometo de etídio.
- Radiomarcção da Leuc-B com radioisótopos usados na medicina nuclear ($I^{125/131}$)
- Realizar o controle de qualidade radioquímico das moléculas radiomarcadas.
- Avaliar a manutenção da atividade biológica da molécula da radiomarcada.
- Estudar o padrão de biodistribuição das moléculas ^{125}I -Leuc-B em animais com tumor de Ehrlich.
- Avaliar a eficiência das moléculas radiomarcadas em detectar sítios tumorais *in vivo* de forma a verificar seu potencial uso terapêutico e para diagnóstico de tumores por imagem.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 INFRAESTRUTURA

Este trabalho foi realizado em colaboração com o Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas I da Fundação Ezequiel Dias – FUNED, sob co-orientação do Dr. Eladio Flores Sanchez, no contexto de um convênio de cooperação técnica já firmado entre FUNED-CDTN. Este laboratório possui uma infra-estrutura disponível para o isolamento e caracterização de proteínas. Toda a parte de caracterização farmacológica *in vitro* e *in vivo*, bem com o manuseio de material radioativo foi realizada no Laboratório de Radiobiologia do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear – CDTN, sob orientação da prof. Dra. Raquel Gouvêa dos Santos. Este laboratório, além de possuir toda a infraestrutura para a utilização de material radioativo possui laboratórios adequados para cultivo celular e caracterização das propriedades farmacológicas de peptídeos.

O trabalho foi realizado em 3 etapas:

- 1- Fracionamento, purificação e quantificação do material protéico isolado da peçonha de *B.leucurus*.
- 2- Avaliação do potencial antitumoral: atividade biológica *in vitro* e *in vivo*.
- 3- Avaliação do potencial radiofarmacêutico: radiomarcagem e perfil biocinético.

5.2 A PEÇONHA

A peçonha de *Bothrops leucurus* foi obtida de vários exemplares provenientes do estado da Bahia e mantidos no serpentário da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais. A peçonha foi liofilizada e mantida a – 20°C até o uso. Devido às propriedades farmacológicas das metaloproteases com domínio desintegrina-*like* apenas a Leucurolisina-B (Leuc-B) foi utilizada nos experimentos.

5.3 PURIFICAÇÃO DA LEUC-B

Os procedimentos de purificação foram feitos a temperatura de 4°C. Os tubos foram coletados e suas concentrações de proteínas foram determinadas pela leitura em espectrofotômetro a 280 nm. Após cada etapa de purificação as frações coletadas foram submetidas a atividades proteolíticas usando dimetilcaseína (DMC). O protocolo para a purificação da Leuc-B foi feito de acordo com o descrito por Sanchez et al, (2007).

5.3.1 Cromatografia de filtração molecular em Sephacryl – S-200

No primeiro passo da purificação da peçonha bruta de *B. leucurus*, a mesma foi dissolvida em 12 mL de tampão acetato de amônio 0,05 M, contendo 0,3 M NaCl e 0,02% azida sódica com pH da solução final de 7,5 e centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm. Após esta etapa, o sobrenadante foi retirado e aplicado em duas colunas em série (2,5 x 100 cm cada) de filtração contendo a resina Sephacryl S-200 (Sigma Aldrich) previamente equilibrada com o mesmo tampão. Uma alíquota de 50 µL da amostra foi retirada para ser utilizada em ensaios posteriores.

A coluna foi eluída com um fluxo de 7,2 mL/hora, sendo coletados 7,5 mL de amostra por tubo. A coleta do material foi realizada por coletor de frações automático (Pharmacia) e o material protéico identificado pela absorbância a 280 nm. As frações foram agrupadas e enumeradas de 1 - 9. A fração de interesse (fração 1), já descrito por Sanchez et al (2007), foi selecionada para continuidade da purificação. A presença de SVMPs com domínio desintegrina-like, na fração de interesse foi confirmada pelo ensaio de atividade proteolítica e pela massa molecular.

5.3.2 Cromatografia de filtração molecular em Sephacryl – S-300

Na segunda etapa de purificação, o material (29,7 mg) proveniente da primeira fração da S-200 foi concentrado em uma membrana de diálise a um volume final de 3 mL e posteriormente aplicado em uma coluna (1,5 x 100 cm) contendo resina Sephacryl S-300. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão Hepes 25 mM, CaCl₂ 2 mM, (pH 7,5), com fluxo de 6,2 mL/hora, sendo coletados 5,2 ml/tubo. As frações de proteína foram monitoradas pela

absorbância a 280 nm. A fração 2 apresentou maior atividade proteolítica e massa molecular em torno de 55 kDa, sendo, por isso, separada, dialisada e liofilizada.

5.3.3 Cromatografia de troca iônica DEAE Sepharose CL-6B

A fração 2 (26 mg) da cromatografia anterior foi dissolvida em 2 ml de tampão Hepes 50 mM, CaCl₂ 2mM (pH 7,4) e aplicada em uma coluna de troca iônica DEAE-Sepharose CL-6B equilibrada com o mesmo tampão. O material ativo foi eluído com gradiente linear de 0-0,3 M NaCl, com fluxo de 12 mL/hora, coletando-se frações de 6 mL/tubo.

A proteína purificada (pool d) foi analisada por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poli(acrilamida) e este foi corado usando Coomassie Blue para verificação da homogeneidade da amostra e confirmação da sua massa molecular que a identifica como Leuc B.

5.4 ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA

O conteúdo protéico foi estimado pelo método de Lowry (Lowry et al, 1951). Foram utilizados 25 µL, 50 µL e 100 µL de soroalbumina bovina (1mg/mL) e uma fração (20 µL) da Leuc-B, obtida da cromatografia de troca iônica DEAE- Sepharose CL-6B.

Para a dosagem, acrescentou-se 5 ml de solução A: 2 ml CuSO₄ 1% + 2 ml tartarato de sódio 4% e 96 mL de Na₂CO₃ 0,3 M em 1M de NaOH. Após 10 minutos, acrescentou-se 500 µl de solução B: reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água destilada na proporção de volume de 1:2. Agitou-se e, após 10 minutos, foi feita a leitura com absorbância a 660 nm.

5.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS -PAGE)

A eletroforese em gel de poli(acrilamida) em presença de dodecilsulfato de sódio (SDS PAGE) foi realizada com o intuito de analisar o perfil protéico do veneno bruto e das frações purificadas, segundo método de Laemmli (1970).

O preparo do gel SDS-PAGE (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) e corrida eletroforética foram realizados de acordo com Laemmli (1970). O gel de separação de 12% foi preparado a partir de uma solução estoque de acrilamida 30%, bis acrilamida 0,8%, SDS 10%, persulfato de amônio 10%, TEMED, Tris-HCL 1,5 M, pH 8,8. Para o gel de concentração, a solução estoque foi diluída a 4% em Tris-HCL 0,5 M, pH 6,8 e SDS 0,1%. Os padrões de massa molecular utilizados foram: galactosidase (116,0 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), soro albumina bovina (66,2 kDa), álcool desidrogenase (37,6 kDa), anidrase carbônica (27,5 kDa), mioglobina (18,4 kDa), lisozima (14,0 kDa).

Após a migração do material, o gel foi corado com Coomassie Blue e descorado em solução de etanol: ácido acético (1:2 v/v) para identificação das bandas protéicas

5.6 OS ANIMAIS

Todos os experimentos com animais foram feitos de acordo com o Manual sobre os cuidados no uso de animais de laboratório (*Institute of Laboratory Animal Resources – Commission on Life Sciences – National Research Council – Washington D.C.*), como recomendado pela SBCAL (Sociedade Brasileira em Ciência de Animais de Laboratório), antigo Colégio Brasileiro de Experimentação animal (COBEA), e de acordo com protocolo aprovado junto ao Comitê de ética em experimentação animal da UFMG – CETEA-UFMG .

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, pesando de 25-30 gramas, obtidos no Centro de bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Os camundongos foram acondicionados em gaiolas pequenas (30x20x15cm), recebendo ração e água potável *ad libitum*, em estante ventilada (Alesco) para animais que mantêm o ambiente com temperatura a 25°C e com ciclos dia-noite (12/12 horas). Ao final dos experimentos os animais foram sacrificados pelo método da guilhotina.

5.7 CULTIVO CELULAR

As linhagens de células tumorais U87, T98, RT2, MCF7 e UACC foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's modifield Eagle médium (DMEM) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina. As células foram mantidas em atmosfera úmida com 5% de CO₂ e a temperatura de 37° C. Para os experimentos foram utilizadas células em fase logarítmica de crescimento com 70-80% de confluência. Após serem tratadas com tripsina bovina por aproximadamente 3 minutos, as células foram contadas com o auxílio de câmara Neubauer e a viabilidade das mesmas avaliadas com Azul de Tripán (FIG.18).

O azul de Tripán é um corante de alto peso molecular capaz de entrar apenas em células mortas ou que possuam aumento na permeabilidade da membrana. Células vivas, em perfeito estado (membrana impermeável), permanecem incolores enquanto células mortas ou com a permeabilidade de membrana aumentada são visualizadas em azul. Para realização dos experimentos foram utilizadas células viáveis (incolores) na faixa de passagem: 5-30, para todas as linhagens.

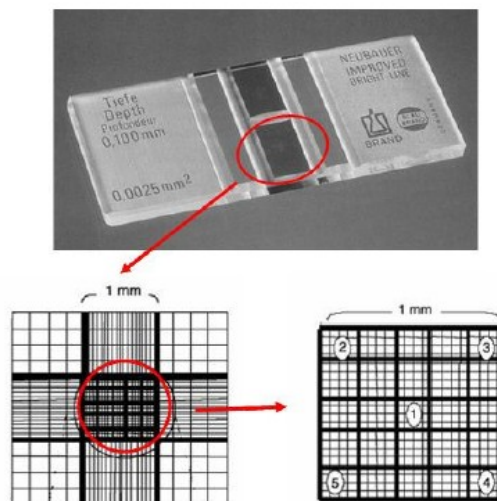


FIGURA 18- Câmara de Neubauer

A manutenção das culturas foi garantida através do congelamento a -80°C e -120°C de alíquotas contendo 5×10^6 células/mL em DMEM enriquecido de 50% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina e 10% de DMSO.

As células de Carcinoma Ascítico de Ehrlich foram cedidas pelo Dr. Geovanni Dantas Cassali, do Departamento de Patologia Geral - ICB/UFMG (Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal de Minas Gerais). A propagação do tumor, para manutenção da cultura de células *in vivo*, foi realizada por meio de injeções intraperitoneais de 0,2 mL de fluido ascítico recém extraído de um camundongo doador (inoculado 7/8 dias antes) em um camundongo receptor. Estas células foram utilizadas nos experimentos de citotoxicidade *in vitro* assim como para o desenvolvimento do modelo animal de tumor em camundongos Swiss fêmea. A avaliação da viabilidade celular também foi realizada através do teste de exclusão do Azul de Tripán.

5.8 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE *IN VITRO* DA PBL E DA LEUC-B EM CÉLULAS TUMORAIS

O ensaio do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT), foi primeiramente descrito por Mosmann. É baseado na habilidade de enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias e no citoplasma de células viáveis em clivar os anéis de tetrazólio amarelo claro do sal MTT e formar cristais de formazan azuis escuros, os quais são altamente impermeáveis à membrana celular. Desta forma, ocorre um acúmulo de cristais azuis em células saudáveis, que são facilmente solubilizados pela adição de um detergente. O número de células viáveis é diretamente proporcional ao nível de formazan produzido (MOSMANN, 1983).

Para o experimento células de diferentes linhagens tumorais (U87, T98, RT2 MCF7, UACC e Ehrlich), foram semeadas em placas de cultura de 96 poços e incubadas por 24 horas para aderência. Após esse tempo, foram adicionadas diferentes concentrações de Leuc-B e PBL nas células aderidas. Em seguida, as células foram novamente incubadas por 48 horas. Transcorrido este tempo, as células foram incubadas com o MTT (0,5 mg/mL) durante 4 horas, ao abrigo da luz. Posteriormente, o sobrenadante contendo MTT foi retirado com o auxílio de uma bomba a vácuo, e 100 µl de DMSO foi adicionado em cada poço para solubilizar os cristais de Formazan. A leitura da placa foi feita por medida espectrofotométrica em um leitor de microplaca UV-visível (Molecular Devices) a 570 nm. Os experimentos foram feitos em triplicatas e o valor do IC₅₀ (concentração do composto que

produziu 50% de morte celular) foi determinado graficamente usando o programa *Graphpad Prism*.

5.9 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

Para análises morfológicas das células foi utilizado Microscópio Óptico Invertido Nikon. Estas análises foram realizadas conjuntamente com os testes de citototoxicidade, onde as culturas foram fotografadas para registros de possíveis alterações na morfologia celular, sendo as imagens adquiridas com Câmera Digital Nikon Coolpix 4500 utilizando contraste de fase.

5.10 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DO DNA CROMOSSOMAL INDUZIDAS PELA LEUC-B ATRAVÉS DA COLORAÇÃO COM DAPI

O DAPI (4',6- diamidine- 2'- phenindole dihydrochloride) é um corante fluorescente capaz de se ligar especificamente às fitas duplas do DNA cromossomal (KUBOTA et al., 2000). Para análise das alterações do DNA cromossomal, células de diferentes linhagens tumorais (U87, T98, RT2, MCF7, UACC e Ehrlich) foram semeadas em placas de 96 poços e, após 48h, foram tratadas com Leuc-B em diferentes concentrações. Após 24h de tratamento, as células foram lavadas 1x com PBS e fixadas em metanol (gelado) por 20 minutos. Após fixação, as células foram lavadas novamente 1x com PBS e incubadas por 30 minutos com DAPI (SIGMA – Chemical Co.) na concentração de 400 ng/mL, diluído em PBS.

Após incubação, o sobrenadante contendo DAPI foi retirado com auxílio de bomba a vácuo e as células foram lavadas 5x com PBS. A visualização dos núcleos das células corados com DAPI foi feita em microscópio de fluorescência (Nikon- 385-410 nm).

5.11 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DO DNA CROMOSSOMAL INDUZIDAS PELA LEUC-B ATRAVÉS DA COLORAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA/BROMETO DE ETÍDIO.

Para análise das alterações do DNA cromossomal através da coloração com laranja de acridina (LA) e do brometo de etídio (BE), células de diferentes linhagens tumorais (U87, T98, RT2, MCF7, UACC e Ehrlich) foram semeadas em placas de 96 poços e, após 48h, foram tratadas com Leuc-B em diferentes concentrações. Após 24h de tratamento, o sobrenadante foi retirado e as células foram tratadas com uma solução de LA/BE (1µg/mL) dissolvida em meio de cultura DMEM. Após 30 minutos, essa solução foi retirada e foi acrescentado aos poços 100 µL de meio DMEM.

A visualização dos núcleos das células corados com LA/BE foi feita em microscópio de fluorescência (Nikon- 500 – 515 nm). As análises foram feitas de acordo como o apêndice A.

5.12 SÍNTESE DA SONDA RADIOATIVA COM OS RADIOISÓTOPOS ^{125}I E ^{131}I .

Todos os experimentos utilizando materiais radioativos foram feitos de acordo com as normas de proteção radiológicas adotadas pela CNEN 3.01 e devidamente supervisionados por profissional licenciado da CNEN. As bancadas foram devidamente forradas, os EPIs (jalecos, luvas, dosímetros, óculos de proteção) foram utilizados. Os rejeitos foram etiquetados devidamente com informações como: identificação do radioisótopo, tipo de rejeito, tipo de emissão, etc. Foi utilizada blindagem adequada para cada tipo de radioisótopo e a monitoração de possíveis contaminações de superfície foi analisada com detector Geiger-Muller.

Com a finalidade de se avaliar a interação específica de Leuc-B com tumores *in vitro* e *in vivo* e de se avaliar seu perfil de biodistribuição *in vivo*, foram desenvolvidas sondas radioativas com radioisótopos ^{125}I e ^{131}I .

Para os ensaios de interação das moléculas radiomarcadas com o alvo de ação, a marcação com o I^{125} (meia vida de 60 dias, emissão de fóton gama de energia entre 27 e 35,5 keV) tem inúmeras vantagens sobre o ^{131}I : maior eficiência de contagem, maior abundância de isótopos, meia-vida de 60 dias e devido às emissões menos energéticas proporciona maior segurança para o operador (SOPRANI et al, 2008).

A marcação com ^{131}I é muito utilizada para estudos de imagem. Trata-se de um radioisótopo emissor de radiação beta (606 keV) e radiação gama (364 keV). O ^{131}I possui uma meia vida de 8 dias (THRALL, ZIESSMAN & JANIS, 2006).

A iodação se faz por substituição eletrofílica no anel aromático de um próton H^+ por um iodo oxidado. Os reagentes são postos em contato rapidamente e os operadores devem tomar cuidados de radioproteção (CARPENTIER et al, 1979). Os reativos são utilizados a fim de oxidar o iodo que originalmente se encontram na forma de NaI (Iodeto de sódio).

Para a execução do procedimento de marcação, foi utilizado capela de exaustão durante toda a reação devido à volatilização do radioiodo. Todos os reagentes foram mantidos no gelo até o momento da marcação.

Em um tubo de ensaio foi adicionado 0,3 nmol de Leuc-B diluída em PBS, em seguida foi adicionado 5 μ L de $Na^{125}I$ (0,5 mCi), volume calculado a partir do fator de decaimento do iodo-125. Para a marcação com ^{131}I foi utilizado 1 mCi, sendo que o volume utilizado também foi ajustado a partir de cálculos do fator de decaimento do iodo-131.

Após esta etapa adicionou-se 5 μ L de lactoperoxidase (1,25 μ g) e homogeneizou-se o tubo. A reação foi iniciada pela adição de 15 μ L de solução de peróxido de hidrogênio, adicionados em três alíquotas de 5 μ L a cada um minuto. E para finalizar a reação foi adicionado 250 mL de tampão fosfato com BSA no tempo 3 min.

A separação do iodo livre não incorporado à molécula foi feita em uma coluna de troca aniônica Dowex 1-X8 previamente ativada com salina 0,9% e pré-saturada com solução de tampão fosfato com BSA 1%. Esta coluna foi preparada um dia antes do experimento.

O controle de qualidade da síntese da radiomarcagem foi feito por cromatografia ascendente em papel Whattman N°1 (2x20cm) usando como fase móvel metanol saturado com iodeto de potássio. Após a corrida cromatográfica, as fitas foram cortadas em tiras de 1cm e a radioatividade foi medida em um aparelho de espectrometria gama (Wallac Wizard 1480) com eficiência do aparelho de 80% para o ^{125}I e 43% para o ^{131}I . Após o cálculo da eficiência da radiomarcagem, foi possível determinar a atividade específica da Leuc-B radiomarcada.

5.13 ESTABILIDADE DA MOLÉCULA DE LEUC-B MARCADA COM ^{125}I EM SORO FETAL BOVINO

Para avaliar se a ligação entre a ^{125}I -Leuc-B e o radionuclídeo ^{125}I era mantida ao longo do tempo foi feito um teste de estabilidade incubando-se a molécula radiomarcada em soro fetal bovino. Neste experimento amostras de 5 μL da proteína marcada foram incubadas em soro fetal bovino (pH 7,4) a 37 °C. Após os tempos de incubação (1, 2, 3, 6, 24, 48 e 72h) alíquotas de 5 μL foram retiradas para determinação da porcentagem de marcação.

A análise da porcentagem de iodo livre da ^{125}I -Leuc-B foi feita através de cromatografia em papel Whattman, conforme descrito no item 5.12.

5.14 AVALIAÇÃO DA MANUTENÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA LEUC-B MARCADA COM IODO (I).

A avaliação da manutenção da atividade biológica da Leuc-B após marcação com iodo foi confirmada pela realização do teste de atividade enzimática sob dimetilcaseína conforme descreveram Sanches et al, (2007). Sendo que para realização do experimento foi feita uma sonda com iodo estável (K^{127}I).

5.15 ENSAIOS DE INTERAÇÃO *IN VITRO* DA ^{125}I -LEUC-B COM ALVOS DE AÇÃO PRESENTES NA MEMBRANA DE CÉLULAS TUMORAIS

O estudo de interação dos polipeptídeos radiomarcados com os receptores de membrana de células tumorais (CAE, MCF7, U87, T98, RT2, UACC) foi feito através da incubação de células íntegras (1×10^6 cél/ponto) com ^{125}I -Leuc-B na ausência (ligação total) ou presença (ligação não específica) de um excesso de 1000 vezes dos polipeptídeos nativos. A incubação foi feita em tampão Tris 50 mM, 2 mM de CaCl_2 e 0,1% de BSA (Albumina Sérica Bovina), durante 1 hora a 37°C . Após incubação os polipeptídeos ligados às células foram separados dos polipeptídeos livres por centrifugação (Beckman) a 12500 rpm. Após a retirada do sobrenadante o precipitado foi lavado 3 vezes com Tris 50 mM, 1% de BSA e a radioatividade foi medida no aparelho de espectrometria gama. O cálculo da ligação específica dos polipeptídeos radiomarcados às células tumorais foi feito através da subtração da ligação não específica da ligação total.

5.16 EXPERIMENTOS DE BIODISTRIBUIÇÃO E DETECÇÃO DE SÍTIOS TUMORAIS *IN VIVO*

A capacidade de detecção de sítios tumorais *in vivo* da Leuc-B radiomarcada com ^{125}I foi avaliada em camundongos implantados com tumor de Ehrlich ascítico (CAE). Este tipo de tumor possui alto índice mitótico e caracteriza-se pela presença de poucas células inflamatórias, estroma escasso e presença de células anaplásicas. Além disso, é facilmente induzido em animais saudáveis que não sejam imunossuprimidos através do transplante direto de células tumorais retiradas de um animal que já possua a neoplasia desenvolvida (DAGLI, 1889). O tumor de Ehrlich foi mantido através do transplante intraperitoneal seriado em camundongos Swiss, fêmeas, realizado em intervalos de 7 dias.

As células foram preparadas para o implante através da lavagem, contagem e avaliação da viabilidade das mesmas pela exclusão do azul de tripan conforme descrito anteriormente. Foram retirados 3 mL do fluido ascítico de camundongos pré-inoculados há 10 dias com tumor de Ehrlich na cavidade peritoneal. Este procedimento foi realizado com auxílio de seringas descartáveis e estéreis. O fluido retirado foi lavado com salina fisiológica até a

obtenção de um líquido denso e claro, correspondendo a uma suspensão celular com o mínimo de fibrina e hemácias. Foram inoculadas $2,5 \times 10^6$ células entre os coxins plantares do membro posterior esquerdo dos animais (com auxílio de agulhas estéreis) para obtenção do tumor na forma sólida. Após dez dias do implante do tumor, os animais foram utilizados nos experimentos de biodistribuição.

A biodistribuição da ^{125}I -Leuc-B diluída em salina foi realizada com injeções endovenosas na cauda, limitando-se a um volume máximo de 250 μL . A eutanásia dos camundongos foi feita após os tempos previamente determinados de 0, 10, 30, 60, 180, 360, 1440 minutos. Logo após o sacrifício, os animais foram dissecados e seus órgãos (tiróide, coração, pulmões, fígado, baço, pâncreas, estômago, intestino, bexiga, rins, músculo esquelético, ossos e cérebro) foram retirados, lavados com salina e pesados. Patas e cauda também foram removidas para avaliação do perfil de biodistribuição bem como da interação com tumor. Também foram coletados sangue e urina. A radioatividade (emissão gama) em cada órgão foi determinada no contador gama, tipo poço, automático, modelo 1480 Wizard 3 com eficiência do aparelho de 82% para o ^{125}I .

Numa tentativa de otimizar a detecção do tumor e aumentar o tempo de residência do radiofármaco no sítio tumoral também foram realizados experimentos de biodistribuição com injeções ministradas via intratumoral. Além disso, foi realizada uma biodistribuição de competição *in vivo* da ^{125}I -Leuc-B.

5.17 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL USO DA ^{131}I -LEUC-B PARA RADIODIAGNÓSTICO NA MEDICINA NUCLEAR

Uma avaliação preliminar do potencial uso da Leuc-B na detecção de tumores por imagem cintilográfica foi realizada com a sonda radioativa de ^{131}I -Leuc-B injetada via endovenosa caudal. Para otimizar a obtenção da imagem foi realizada também uma avaliação da ^{131}I -Leuc-B com injeção intratumoral. Aproximadamente 10 dias antes do experimento camundongos Swiss fêmeas entre 25-30 gramas foram inoculados com $2,5 \times 10^6$ de tumor ascítico de Ehrlich entre os coxins na região plantar do membro posterior direito.

As imagens foram obtidas nos tempos 3 e 24 horas após a injeção endovenosa caudal de 7,4 MBq de ^{131}I -Leuc-B. A imagem realizada com injeção intratumoral de ^{131}I -Leuc-B (1,2 MBq) foi adquirida nos tempos 3, 24 e 72 horas. Nos tempos pós injeção acima determinados os animais foram anestesiados intraperitonealmente por Virboxil® (cloridrato de xilazina) associado a Francotar® (Quetamina). Após anestesia, os animais foram posicionados e fixados de forma a garantir a completa imobilização, o que é necessário para a perfeita aquisição da imagem. Imagens ventrais de corpo inteiro foram adquiridas por 15 minutos em Gama Câmara G&E Healthcare Millenium.

5.18 CÁLCULOS FARMACOCINÉTICOS

Para simplificação dos cálculos realizados neste trabalho foi assumido que o perfil farmacocinético correspondia ao modelo monocompartimental (apêndice B). Os cálculos de farmacocinética foram feitos de acordo com Gibaldi & Perrier, (2007).

5.19 ANÁLISE DOS DADOS

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas, inclusive os respectivos grupos controles. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA. Foram considerados significativos aqueles dados com $P < 0,05$.

5.20 FINANCIAMENTO

Este projeto foi financiado pelo Plano plurianual de atividades (PPA) do CDTN: Desenvolvimento de novos radiofármacos.

6 RESULTADOS

6.1 PURIFICAÇÃO DA LEUC-B

6.1.1 Cromatografia de filtração molecular em sephacryl – S200

pós três etapas de purificação foi isolada uma nova metaloproteinase da peçonha de *Bothrops leucurus* (SANCHEZ et al, 2007). A FIG. 19 representa o resultado do fracionamento da peçonha bruta de *B. leucurus* em coluna de filtração molecular em Sephacryl S-200. Primeiramente a peçonha foi fracionada em 9 porções (1-9). A atividade proteolítica sob DMC foi encontrada nas frações 1 e 4. A Fração 1 (tubos 133 a 137) contém uma massa molecular alta de aproximadamente 55 kDa (SDS-PAGE) e intensa atividade proteolítica, sendo, por isso, selecionada para a próxima fase.

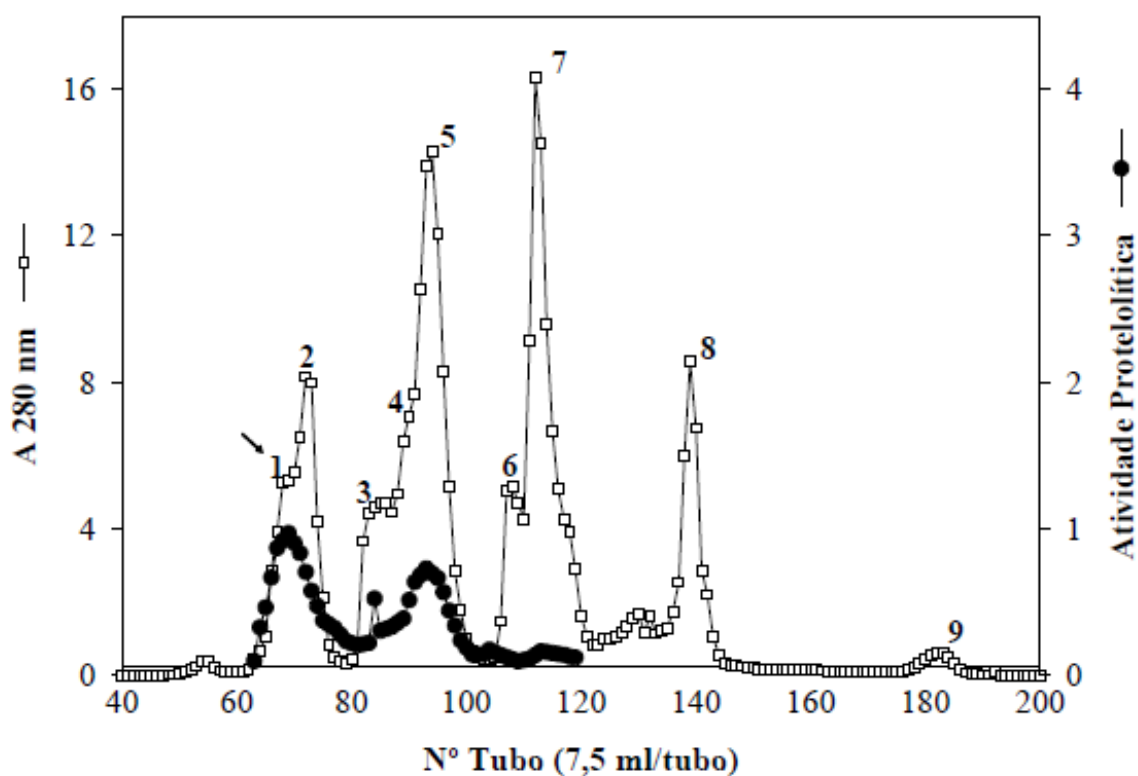


FIGURA 19 - Cromatografia de filtração molecular do veneno bruto de *B. leucurus* em Sephacryl S-200. A peçonha bruta de *B. leucurus* (1,68 mg) foi aplicada em duas colunas (2,6 x 100 cm cada uma) em série. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão acetato de amônio 0,05 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,3 M e azida sódica 0,02%, com fluxo de 7,2 mL/hora à 4°C. As frações coletadas foram monitoradas pela absorbância a 280 nm. A seta

indica os tubos com atividade proteolítica, característica das metaloproteases de classe P-III, que foram incluídas na formação do “pool” (Fração 1).

6.1.2 Cromatografia de filtração molecular em sephacryl – S-300

A FIG.20 apresenta os resultados da separação da fração 1 (29,7 mg), da cromatografia anterior, aplicada em coluna Sephacryl S-300 (100 x 1,5 cm), equilibrada e eluída com tampão Hepes 25 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 7,5. Por este procedimento, a fração 1 foi separada em três principais frações designadas I, II e III, sendo que a fração II também apresentou intensa atividade proteolítica sob DMC e massa molecular em torno de 55 kDa .

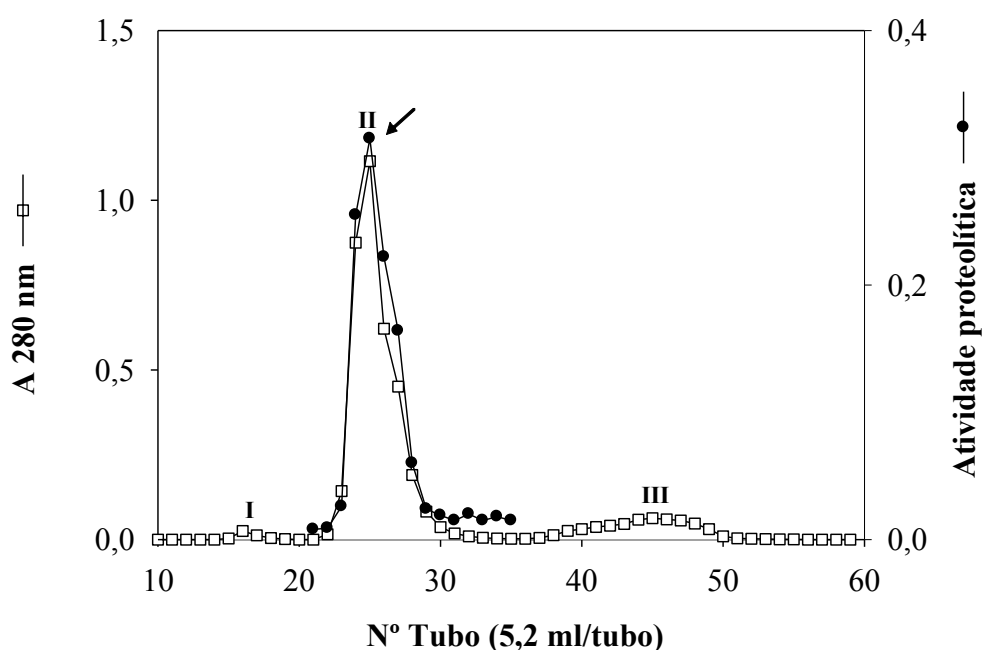


FIGURA 20 - Cromatografia de filtração molecular da fração 2 em Sephacryl S-300. O material referente à fração 1 (26 mg) proveniente da primeira etapa de purificação foi aplicada em coluna (1,5 x 100 cm) empacotada com Sephacryl S-300. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão Hepes 25 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 7,5 com fluxo de 6,2 mL/hora à 4°C. As frações coletadas foram monitoradas pela absorbância a 280 nm. A seta indica os tubos com atividade proteolítica e massa molecular de 55 kDa, característica das metaloproteases de classe PIII.

6.1.3 Cromatografia de troca iônica DEAE Sepharose CL-6B

A fração 2 obtida na etapa anterior foi dialisada, liofilisada e aplicada em uma coluna de troca-iônica DEAE Sepharose CL-6B. A coluna foi equilibrada com tampão Hepes 50mM, CaCl₂ 2 mM (pH 7,4) e eluída com um gradiente de 0,3 M de NaCl.

Esta 3ª etapa apresentou 4 frações (a-d) (FIG. 21). Apesar das frações a, b e d apresentarem considerável atividade proteolítica, a massa molecular em torno de 55 kDa foi encontrada na fração d, sendo esta a Leuc-B.

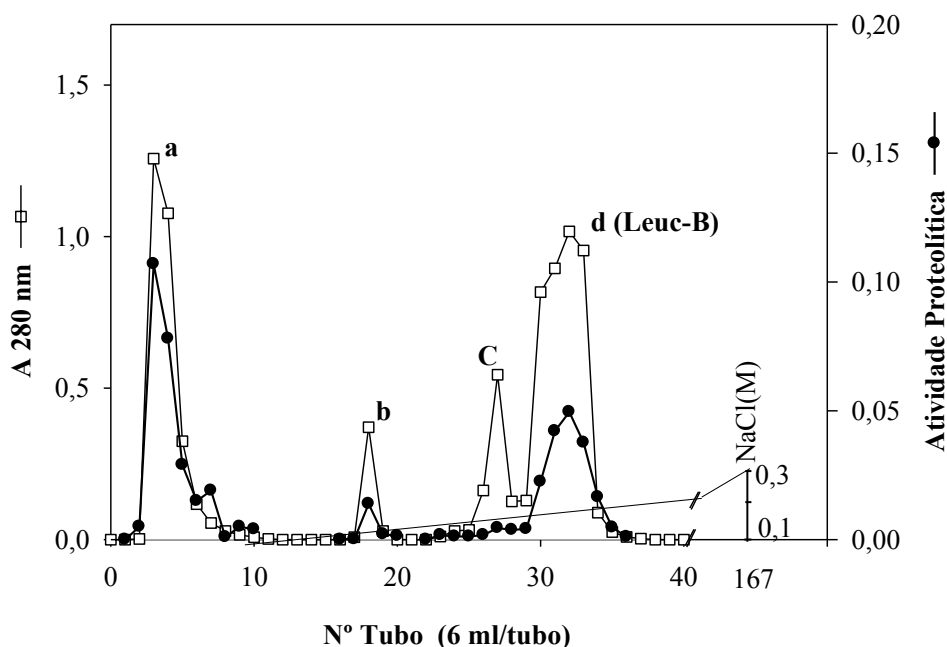


FIGURA 21 - Cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose CL-6B. 26 mg de proteína proveniente da etapa anterior de purificação foi aplicada em coluna de Sepharose CL-6B (1,6 x 20 cm). A coluna foi equilibrada com tampão Hepes 50 mM, CaCl₂ 2 mM (pH 7,4). A eluição foi realizada com gradiente linear de NaCl (0-0,3 M) com fluxo de 12 mL/hora a 4°C. As frações coletadas foram monitoradas pela absorbância a 280 nm.

O processo de purificação da enzima Leuc-B está resumido na TAB.5. A etapa final resultou em rendimento de 4,8% e o fator de purificação foi de 4 com relação a peçonha bruta. A enzima representa 1,2 % das proteínas da peçonha bruta.

TABELA 5 - Purificação da metaloproteinase Leuc-B da peçonha de *B. leucurus*

Etapa	Proteína		Atividade Proteolítica			
	(mg)	(%)	Ativ. específica U/mg de proteína ¹	Total (U)	Rendimento (%)	F.P. ²
Veneno Bruto	1,680	100	8,5	14,280	100	1
Sephacryl S-200	29,7	1,8	35,4	1051	7,4	4
Sephacryl S-300	26,0	1,6	25,2	655	4,6	3
DEAE Sepharose CL-6B	20,0	1,2	34,7	694	4,8	4

¹ Uma unidade de atividade proteolítica sob DMC foi definida como absorvância a 340/min. A atividade específica foi expressa em unidades/mg. ²F.P, Fator de Purificação (SANCHES et al, 2007).

6.2 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS -PAGE)

A verificação da pureza da Leuc-B foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida. A observação de que a amostra contendo Leuc-B migrou como uma única banda protéica sugere a homogeneidade e pureza deste componente. Analisando a migração da Leuc- B em gel pode-se observar que a mesma apresenta uma massa de aproximadamente 55 kDa (FIG.22) .

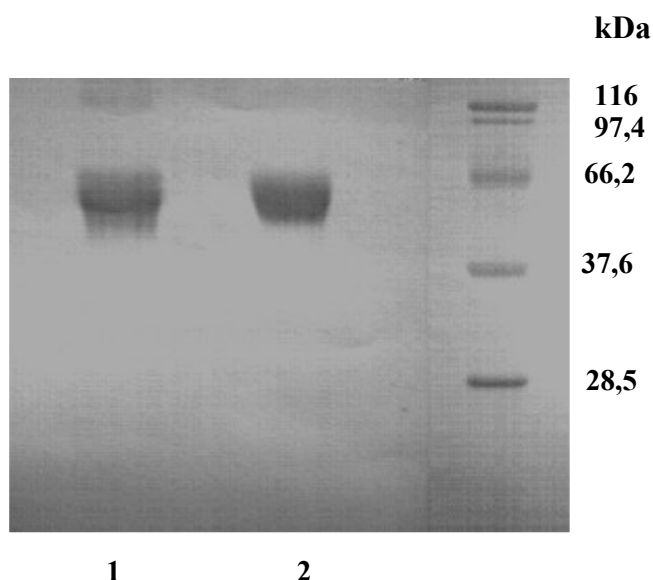


FIGURA 22 - Análise da Leuc-B purificada por SDS-PAGE (gel 12%). 4 μ g de proteína em (1), condições redutoras; (2), condições não redutoras; coluna da direita, marcadores de massa molecular (Calbiochem, galactosidase 116,0 kDa, soro albumina bovina 66,2 kDa, álcool desidrogenase 37,6 kDa, anidrase carbônica 28,5 kDa).

6.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE *IN VITRO* DE PBL E DA LEUC-B EM CÉLULAS TUMORAIS.

A avaliação do potencial antitumoral de PBL e da Leuc-B foi feita através de testes de citotoxicidade pelo método do MTT em células RT2, T98 e U87 (glioblastoma), MCF7 (carcinoma mamário), CAE (carcinoma ascítico de Ehrlich) e UACC (melanoma). As células foram tratadas com diferentes concentrações de PBL e Leuc-B e após 48h foram avaliadas quanto à sobrevivência.

Os resultados obtidos mostraram que tanto PBL quanto a Leuc-B foram citotóxicas, de maneira dose-dependente, para todas as linhagens de células tumorais testadas. No entanto, PBL apresenta maior citotoxicidade para as células.

As células tumorais RT2 foram tratadas com diferentes concentrações de PBL (0,5-20 μ g/mL) e de Leuc-B (1 – 165 μ g/mL). Após 48 horas de tratamento com PBL apresentou IC₅₀ (concentração capaz de reduzir o número de células vivas pela metade) de $3,2 \pm 0,5$ μ g/mL

(FIG.23). A FIG.24 mostra o efeito antitumoral da Leuc-B sobre a viabilidade de células RT2. Os resultados mostram IC₅₀ de 0,22 μM (16 ± 3,01 μg/mL).

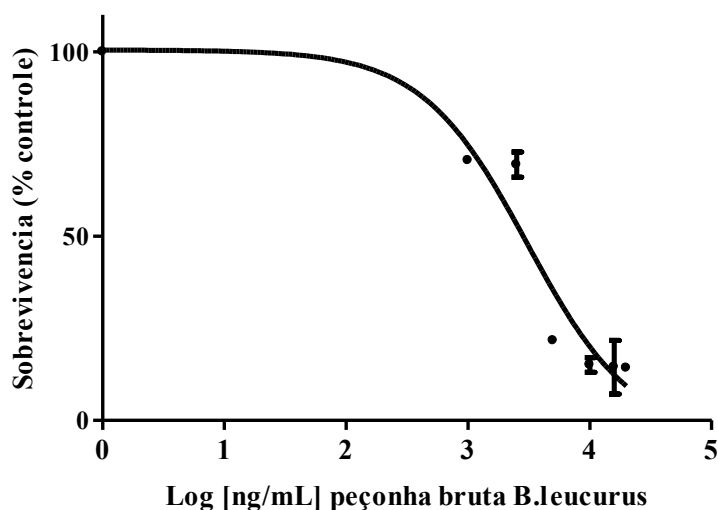


FIGURA 23 - Efeito citotóxico da PBL sobre células RT2. As células foram semeadas em placas de 96 poços numa densidade de 1000 céls/poço e incubadas com diferentes concentrações de peçonha a 37 °C por 48 horas. A taxa de sobrevivência foi medida pelo MTT. As doses (a partir de 2 μg/mL) foram significativamente citotóxicas de maneira dose-dependente com IC₅₀ de 3,2 ± 0,5 μg/mL ($p < 0,05$).

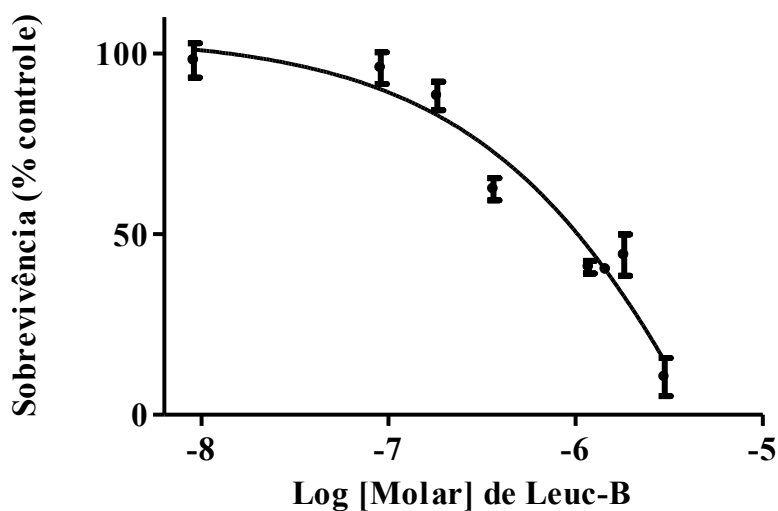


FIGURA 24 - Efeito citotóxico da Leuc-B sobre células RT2. As células foram semeadas em placas de 96 poços numa densidade de 1000 céls/poço e incubadas com diferentes concentrações de Leuc-B a 37 °C por 48 horas. A taxa de sobrevivência foi medida pelo MTT. Leuc-B foi significativamente citotóxica de maneira dose-dependente com IC₅₀ de 0,22 μM (16 ± 3,01 μg/mL) ($p < 0,05$).

O efeito citotóxico da peçonha bruta em células T98 é mostrado na FIG.25. Foram testadas concentrações de 0,5 a 20 $\mu\text{g/mL}$ e, após 48 horas de tratamento, observou-se IC_{50} de $(3,64 \pm 0,32 \mu\text{g/mL})$. Leuc-B também apresentou citotoxicidade dose-dependente nesta linhagem de células, mas estas células apresentaram maior resistência à ação da Leuc-B que as células RT2. Foram testadas concentrações de 0,5 a 165 $\mu\text{g/mL}$ e o IC_{50} foi de $0,54 \mu\text{M}$ ($32 \pm 8,32 \mu\text{g/mL}$). Após 48h de tratamento, na concentração de 165 $\mu\text{g/mL}$, não foram encontradas células vivas (FIG.26).

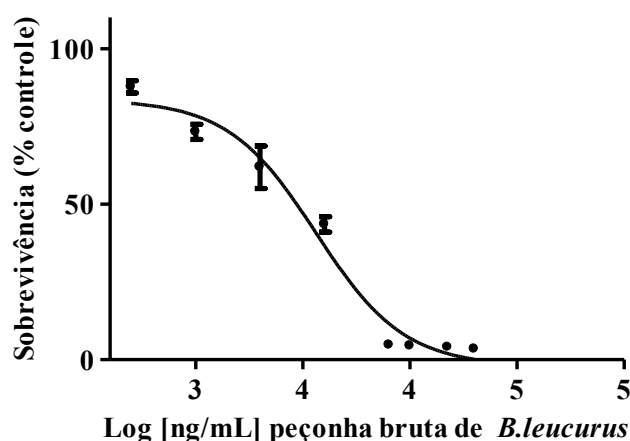


FIGURA 25 - Efeito citotóxico da PBL sobre células T98. As células foram semeadas em placas de 96 poços numa densidade de 1000 céls/poço e incubadas por 24 h. Após este período, foram adicionadas diferentes concentrações de peçonha. Após 48 horas, a sobrevivência celular foi avaliada pelo ensaio do MTT. O IC_{50} foi $3,64 \pm 0,32 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$).

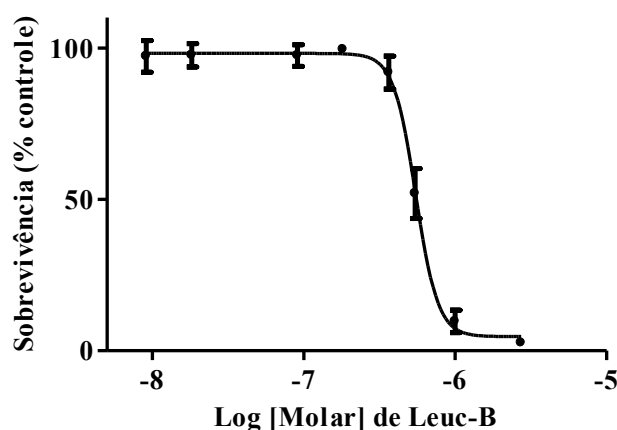


FIGURA 26 - Efeito citotóxico da Leuc-B sobre células T98. As células foram semeadas em placas de 96 poços numa densidade de 1000 céls/poço e incubadas com diferentes concentrações de Leuc-B por 48 horas. A taxa de sobrevivência foi medida pelo MTT. Leuc-B foi significativamente citotóxica de maneira dose-dependente com IC_{50} de $0,54 \mu\text{M}$ ($32 \pm 8,32 \mu\text{g/mL}$) ($p < 0,05$).

Nas linhagens de células tumorais U87 (glioblastoma) foram utilizadas concentrações de 1 a 20 $\mu\text{g/mL}$ de PBL e concentrações de 1 a 165 $\mu\text{g/mL}$ de Leuc-B. A peçonha bruta apresentou efeito citotóxico máximo com concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$ e $\text{IC}_{50} = 2,5 \pm 0,57$ $\mu\text{g/mL}$ (FIG. 27). Já a Leuc-B apresentou efeito citotóxico máximo na concentração de 165 $\mu\text{g/mL}$ com IC_{50} de 0,62 μM ($33 \pm 3,75$ $\mu\text{g/mL}$) (FIG. 28).

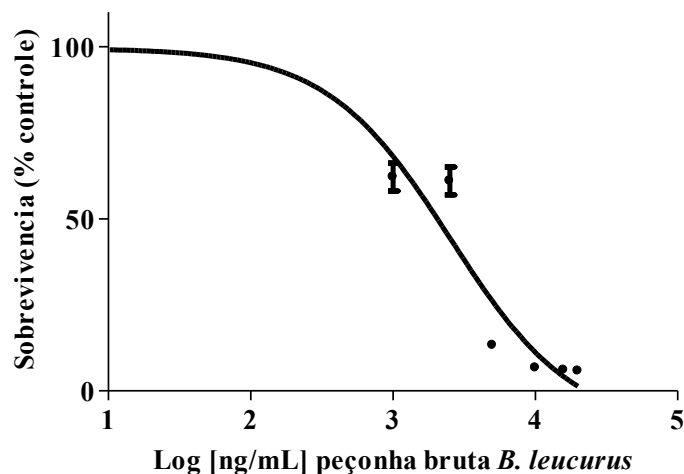


FIGURA 27 - Efeito citotóxico da PBL sobre células U87. As células foram semeadas em placas de 96 poços numa densidade de 1000 céls/poço e incubadas com diferentes concentrações de peçonha a 37 °C por 48 horas. A taxa de sobrevivência foi medida pelo MTT. As doses (a partir de 2 $\mu\text{g/mL}$) foram significativamente citotóxicas de maneira dose-dependente com IC_{50} de $2,5 \pm 0,57$ $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$).

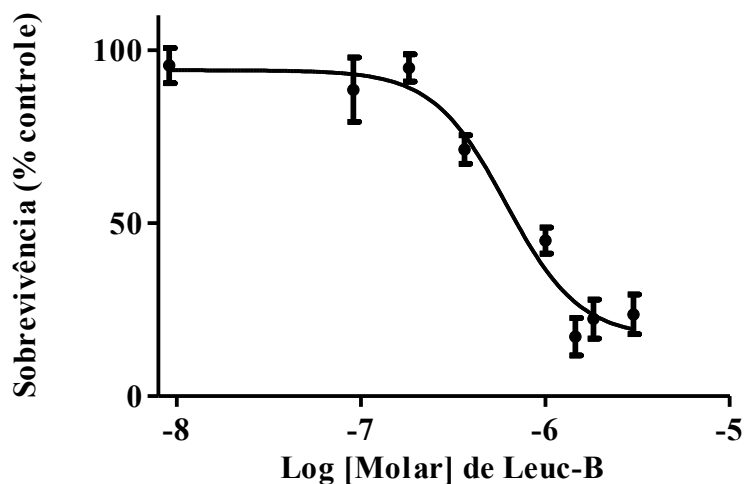


FIGURA 28 - Efeito citotóxico da Leuc-B sobre células U87. As células foram semeadas em placas de 96 poços numa densidade de 1000 céls/poço e incubadas com diferentes concentrações de Leuc-B por 48 horas. A taxa de sobrevivência foi medida pelo MTT. Leuc-B foi significativamente citotóxico de maneira dose-dependente com IC_{50} de 0,62 μM ($33 \pm 3,75$ $\mu\text{g/mL}$) ($p < 0,05$).

O efeito antitumoral de PBL e Leuc-B testado em células CAE também apresentou citotoxicidade dose-dependente. Foram utilizadas concentrações de 1 a 20 $\mu\text{g/mL}$ de PBL e concentrações de 1 a 165 $\mu\text{g/mL}$ de Leuc-B. A peçonha bruta apresentou IC_{50} de $3,6 \pm 0,38$ $\mu\text{g/mL}$ (FIG. 29). Nestas células Leuc-B foi mais potente que nas outras linhagens estudadas, apresentando IC_{50} de 0,2 μM ($10 \pm 2,04$ $\mu\text{g/mL}$) (FIG. 30).

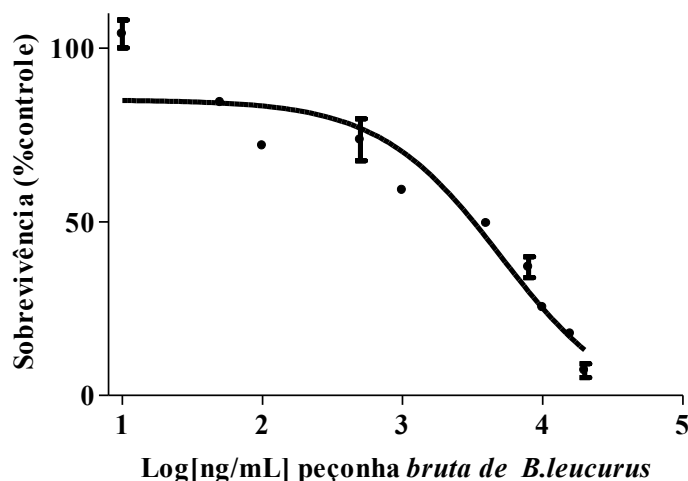


FIGURA 29 - Efeito citotóxico da PBL sobre células CAE. As células foram semeadas em placas de 96 poços numa densidade de 1000 céls/poço e incubadas com diferentes concentrações de PBL por 48 horas. A taxa de sobrevivência foi medida pelo MTT. Leuc-B foi significativamente citotóxica de maneira dose-dependente com IC_{50} de ($3,6 \pm 0,38$ $\mu\text{g/mL}$) ($p < 0,05$).

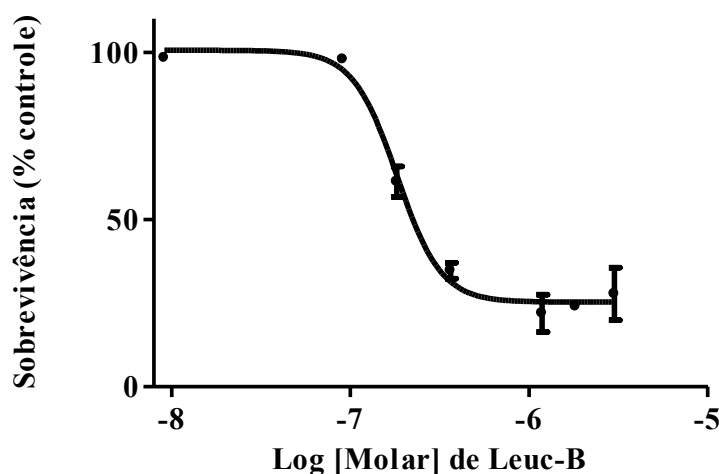


FIGURA 30 - Efeito citotóxico da Leuc-B sobre células CAE. As células foram semeadas em placas de 96 poços numa densidade de 1000 céls/poço e incubadas com diferentes concentrações de Leuc-B por 48 horas. A taxa de sobrevivência foi medida pelo MTT. Leuc-B foi significativamente citotóxica de maneira dose-dependente com IC_{50} de 0,2 μM ($10 \pm 2,04$ $\mu\text{g/mL}$) ($p < 0,05$).

Nas células tumorais de carcinoma mamário (MCF7) o efeito citotóxico foi proporcional ao aumento da concentração da peçonha bruta e de Leuc-B, apresentando IC_{50} de $3,8 \pm 0,37 \mu\text{g/mL}$ (FIG. 31) e $0,45 \mu\text{M}$ ($25 \pm 3,3 \mu\text{g/mL}$), respectivamente (FIG. 32). Foram utilizadas concentrações de 1 a 20 $\mu\text{g/mL}$ de PBL e concentrações de 1 a 165 $\mu\text{g/mL}$ de Leuc-B. Sendo que na concentração de 165 $\mu\text{g/mL}$ a taxa de mortalidade foi de 98,5 %.

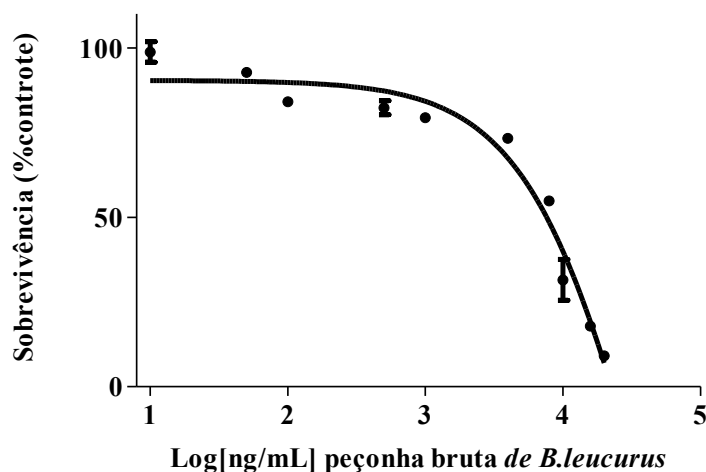


FIGURA 31 - Efeito citotóxico da PBL sobre células MCF7. As células foram semeadas em placas de 96 poços numa densidade de 1000 céls/poço e incubadas com diferentes concentrações de Leuc-B por 48 horas. A taxa de sobrevivência foi medida pelo MTT. Leuc-B foi significativamente citotóxica de maneira dose-dependente com IC_{50} de ($3,8 \pm 0,37 \mu\text{g/mL}$) ($p < 0,05$).

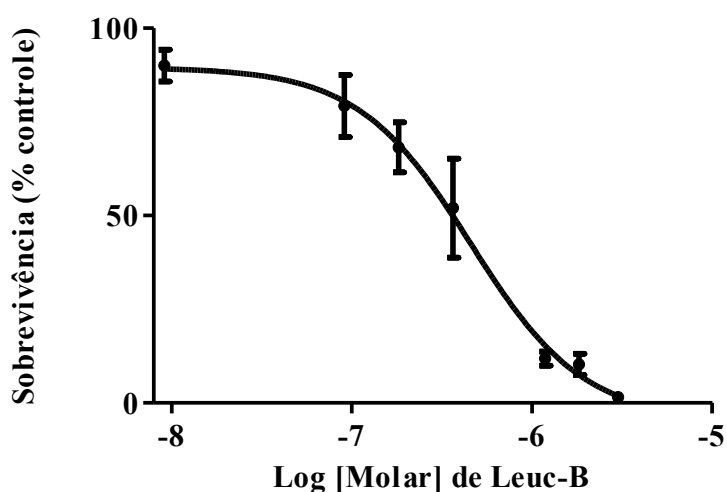


FIGURA 32 – Efeito citotóxico de Leuc-B sobre células MCF7. As células foram semeadas em placas de 96 poços numa densidade de 1000 céls/poço e após 24 horas foram tratadas com diferentes concentrações de Leuc-B. A citotoxicidade foi avaliada após 48 horas de tratamento através do teste MTT. Leuc-B apresentou IC_{50} de $0,45 \mu\text{M}$ ($25 \pm 3,3 \mu\text{g/mL}$) ($p < 0,05$).

A citotoxicidade da PBL e da Leuc-B também foi avaliada em células de melanoma (UACC) e, assim como nas outras linhagens tumorais, apresentou citotoxicidade dose-dependente com IC_{50} de $2 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$ (FIG. 33) e $0,57 \mu\text{M}$ ($32 \pm 1,73 \mu\text{g/mL}$), respectivamente (FIG. 34).

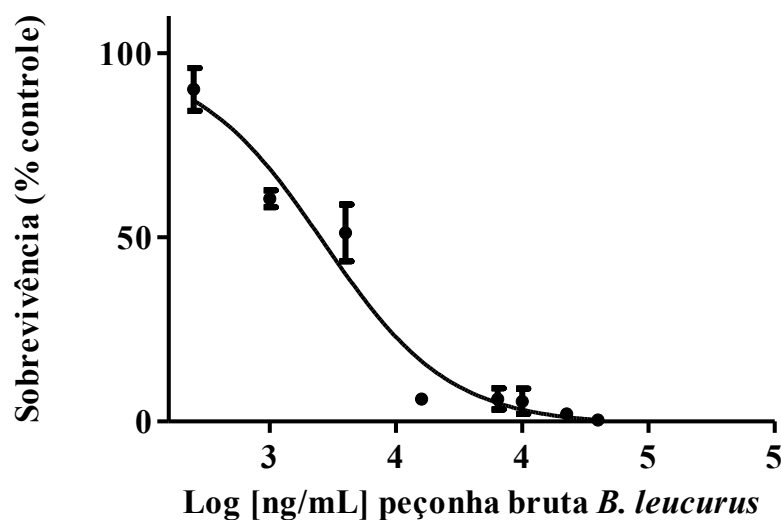


FIGURA 33 - Efeito citotóxico da PBL sobre células UACC. As células foram semeadas em placas de 96 poços para aderência e após 24 horas foram tratadas com diferentes concentrações de PBL. Após 48 horas de tratamento a citotoxicidade foi avaliada pela medida da taxa de sobrevivência, através do teste MTT. PBL apresentou IC_{50} de $2,0 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$).

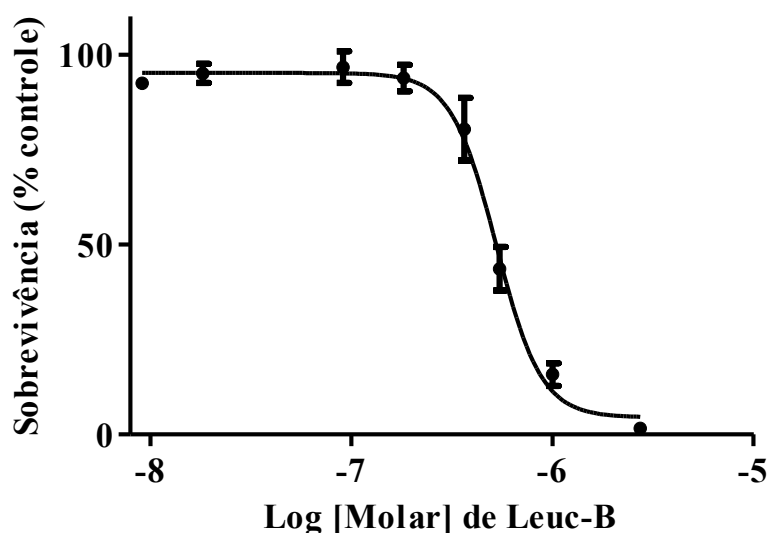


FIGURA 34 - Efeito citotóxico da Leuc-B sobre células UACC. As células foram semeadas em placas de 96 poços para aderência e após 24 horas foram tratadas com diferentes concentrações de Leuc-B. Após 48 horas de tratamento a citotoxicidade foi avaliada pela medida da taxa de sobrevivência, através do teste MTT. Leuc-B apresentou IC_{50} de $0,57 \mu\text{M}$ ($32 \pm 1,73 \mu\text{g/mL}$) ($p < 0,05$).

De acordo com a TAB.6, pode-se observar que efeito citotóxico da peçonha bruta é maior que o da Leuc-B. Isso demonstra que a citotóxicidade do veneno não é devido somente à ação da Leuc-B. A forte ação citotóxica da peçonha bruta pode ser em decorrência de outros componentes do veneno tais como as fosfolipases, as desintegrinas-RGD e outros. A partir dos valores do IC₅₀, foi possível observar também que o efeito citotóxico da Leuc-B foi semelhante para todas as linhagens celulares, incluindo as células tumorais p53 mutantes.

TABELA 6. Valores do IC₅₀ do efeito citotóxico da peçonha bruta de *B.leucurus* e da Leuc-B em células tumorais.

Linhagens celulares	Peçonha bruta	Leuc-B
RT2	3,2 ± 0,50 µg/mL	16 ± 3,01 µg/mL (0,22 µM)
T98*	3,6 ± 0,32 µg/mL	32 ± 8,32 µg/mL (0,54 µM)
U87	2,5 ± 0,57 µg/mL	33 ± 3,75 µg/mL (0,62 µM)
Ehrlich	3,6 ± 0,38 µg/mL	10 ± 2,04 µg/mL (0,20 µM)
MCF7	3,8 ± 0,37 µg/mL	25 ± 3,3 µg/mL (0,45 µM)
UACC	2,0 ± 0,10 µg/mL	32 ± 1,73 µg/mL (0,57 µM)

*p53 mutante

6.4 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

As análises morfológicas das células tratadas com PBL e Leuc-B foram realizadas com auxílio de uma câmera fotográfica digital Nikon Coolpix 4500 utilizando contraste de fase, acoplada ao microscópio óptico (MO). As alterações sofridas pelas células RT2, T98, U87, CAE, MCF7 e UACC após tratamento com PBL e Leuc-B podem ser observadas nas FIG. 35, 36, 37, 38, 39 e 40, respectivamente. Tanto o tratamento das linhagens com PBL quanto o tratamento com Leuc-B causaram alterações morfológicas significativas nas células. As alterações mais aparentes observadas foram redução do volume citoplasmático, formação de vacúolos no citoplasma, irregularidades na membrana plasmática e arredondamento celular. Em todas as linhagens estudadas essas alterações na morfologia foram agravadas com o aumento da concentração de PBL e Leuc-B. Nas células tratadas com Leuc-B, observa-se também uma desadesão das células e formação de aglomerados de células.

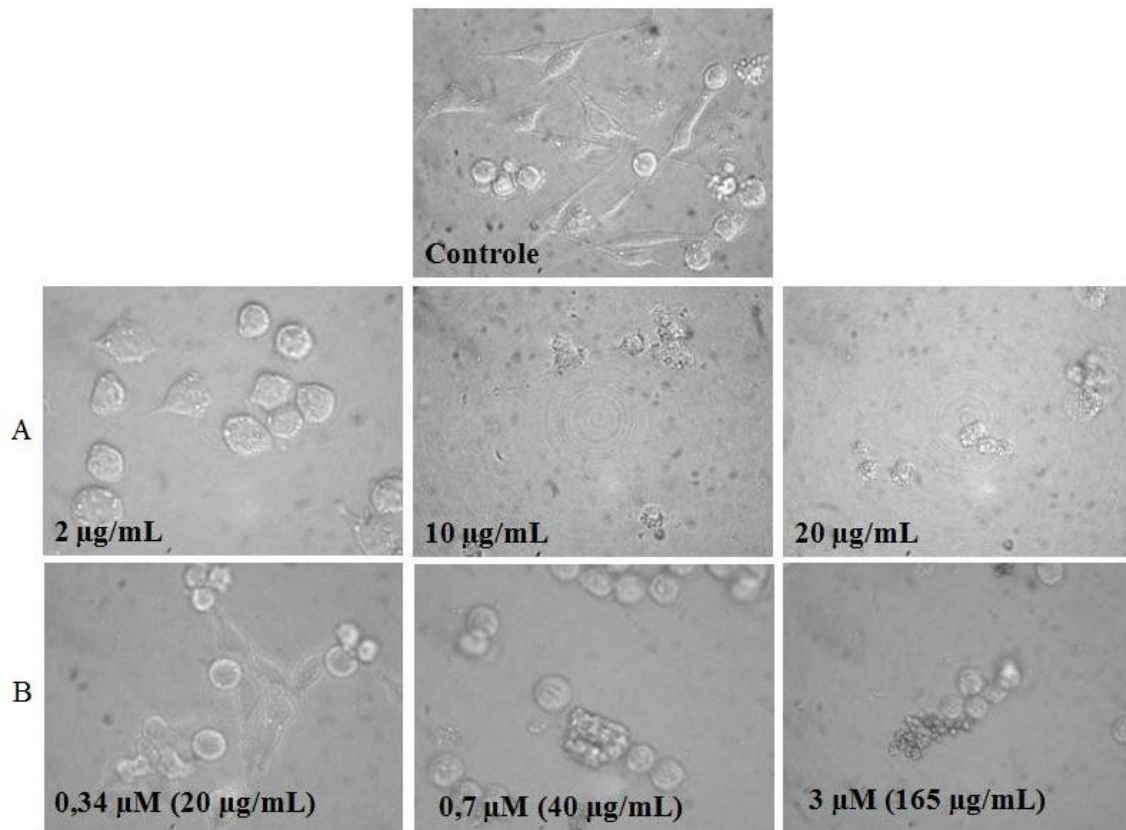


FIGURA 35 - Fotomicrografia óptica de células RT2 tratadas com (A) PBL e (B) Leuc-B: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com PBL e Leuc-B. Imagens adquiridas em Câmera fotográfica Digital Nikon Coolpix 4500 acoplada ao MO (aumento de 400x). As células tratadas apresentaram redução do volume celular e irregularidades na membrana plasmática.

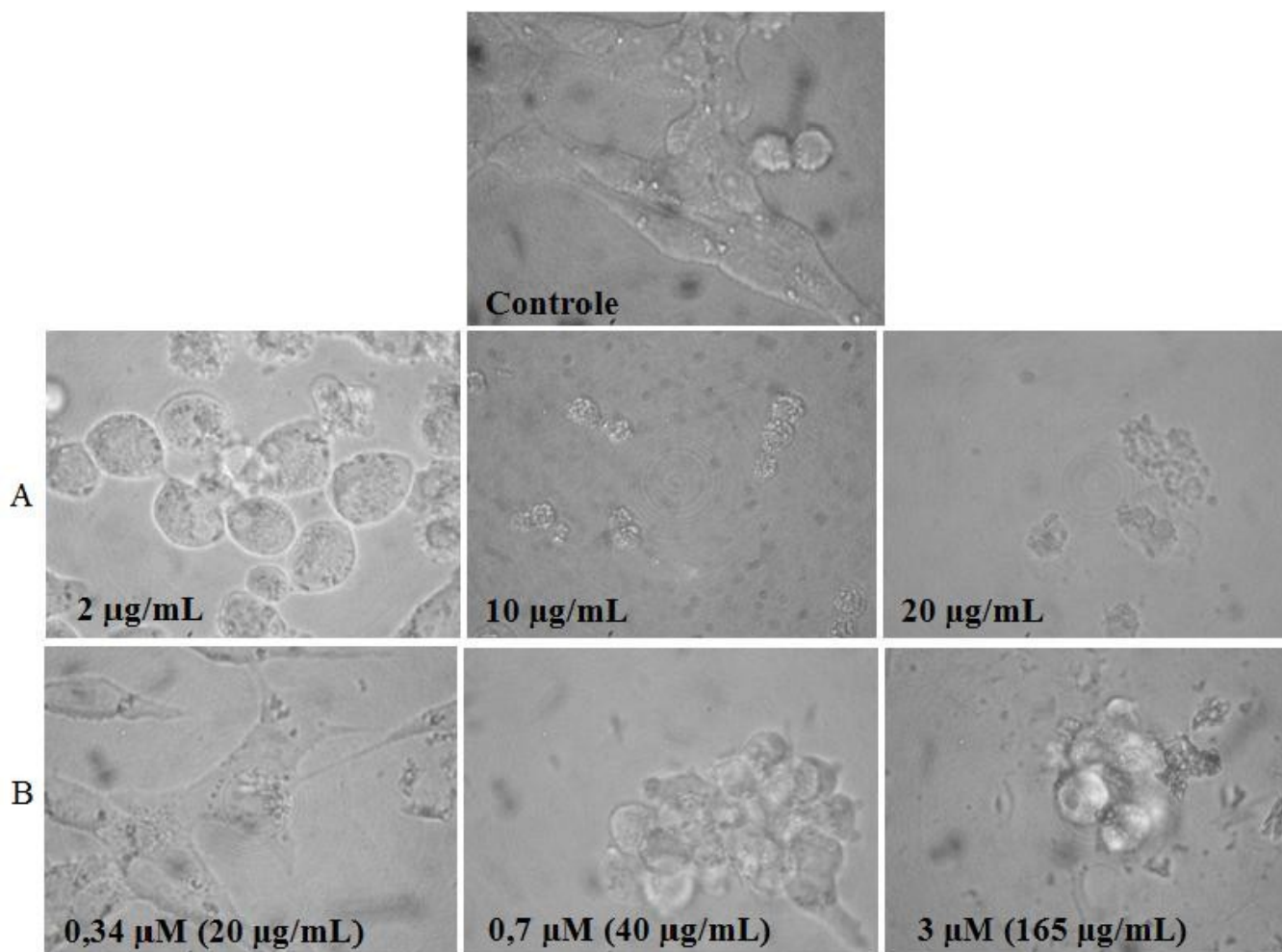


FIGURA 36 - Fotomicrografia óptica de células T98 tratadas com (A) PBL e (B) Leuc-B: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com PBL e Leuc-B. Imagens adquiridas em Câmera fotográfica Digital Nikon Coolpix 4500 acoplada ao MO (aumento de 400x). As células tratadas apresentaram redução do volume celular e irregularidades na membrana plasmática.

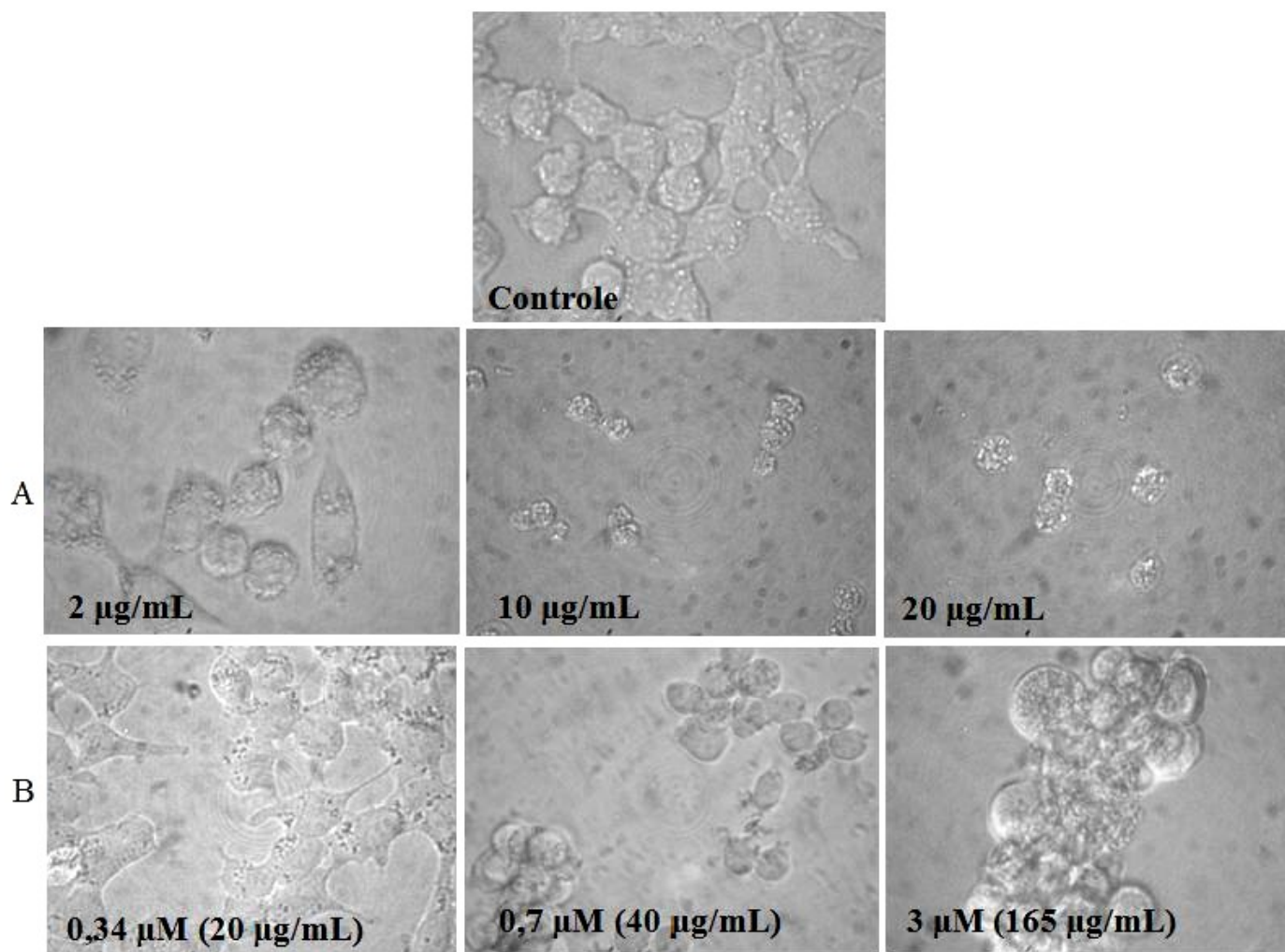


FIGURA 37 - Fotomicrografia óptica de células U87 tratadas com (A) PBL e Leuc-B: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com PBL e Leuc-B. Imagens adquiridas em Câmera fotográfica Digital Nikon Coolpix 4500 acoplada ao MO (aumento de 400x). As células tratadas apresentaram redução do volume celular e irregularidades na membrana plasmática.

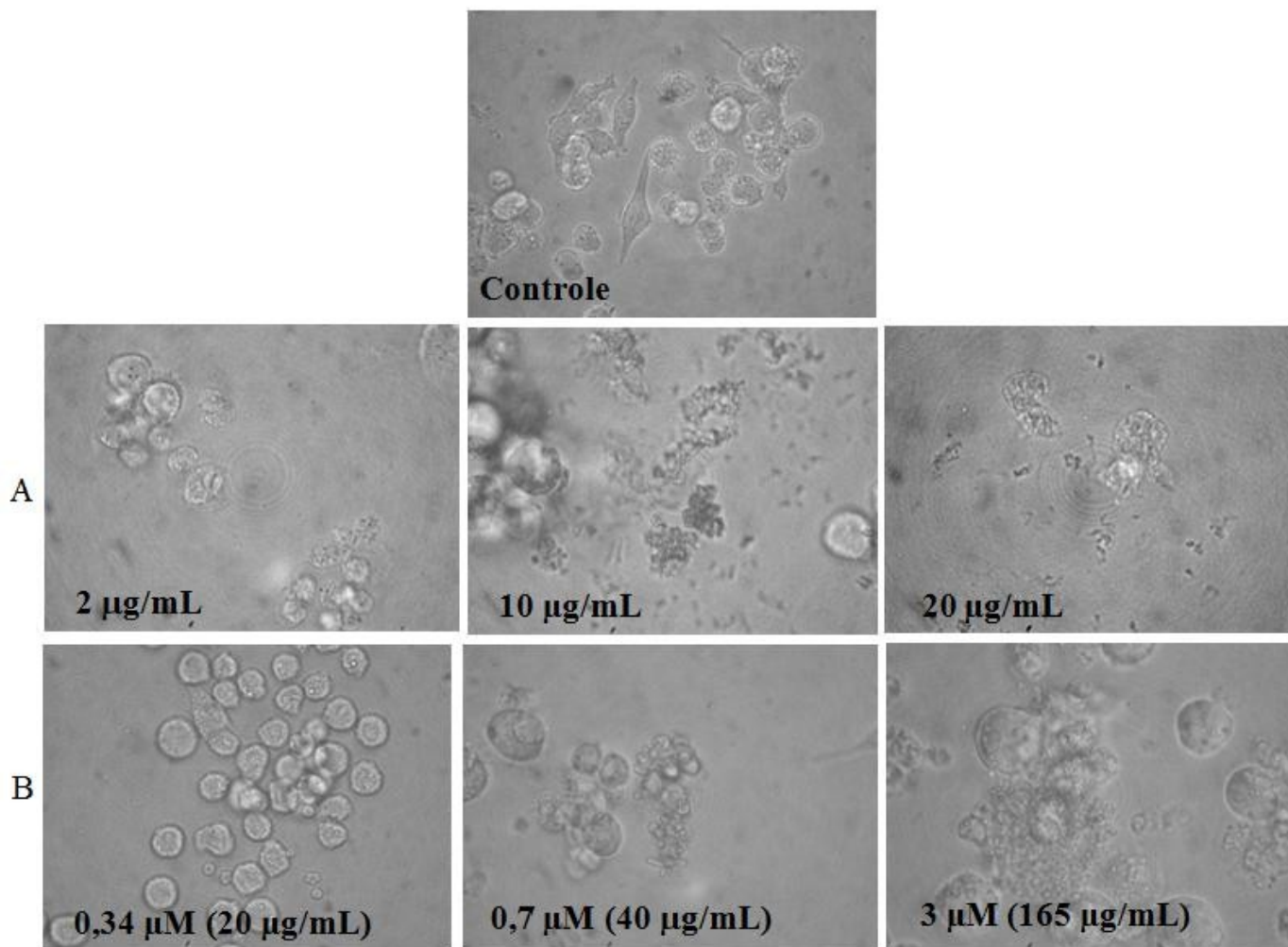


FIGURA 38 - Fotomicrografia óptica de células CAE tratadas com (A) PBL e (B) Leuc-B: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com PBL e Leuc-B. Imagens adquiridas em Câmera fotográfica Digital Nikon Coolpix 4500 acoplada ao MO (aumento de 400x). As células tratadas apresentaram redução do volume celular e irregularidades na membrana plasmática.

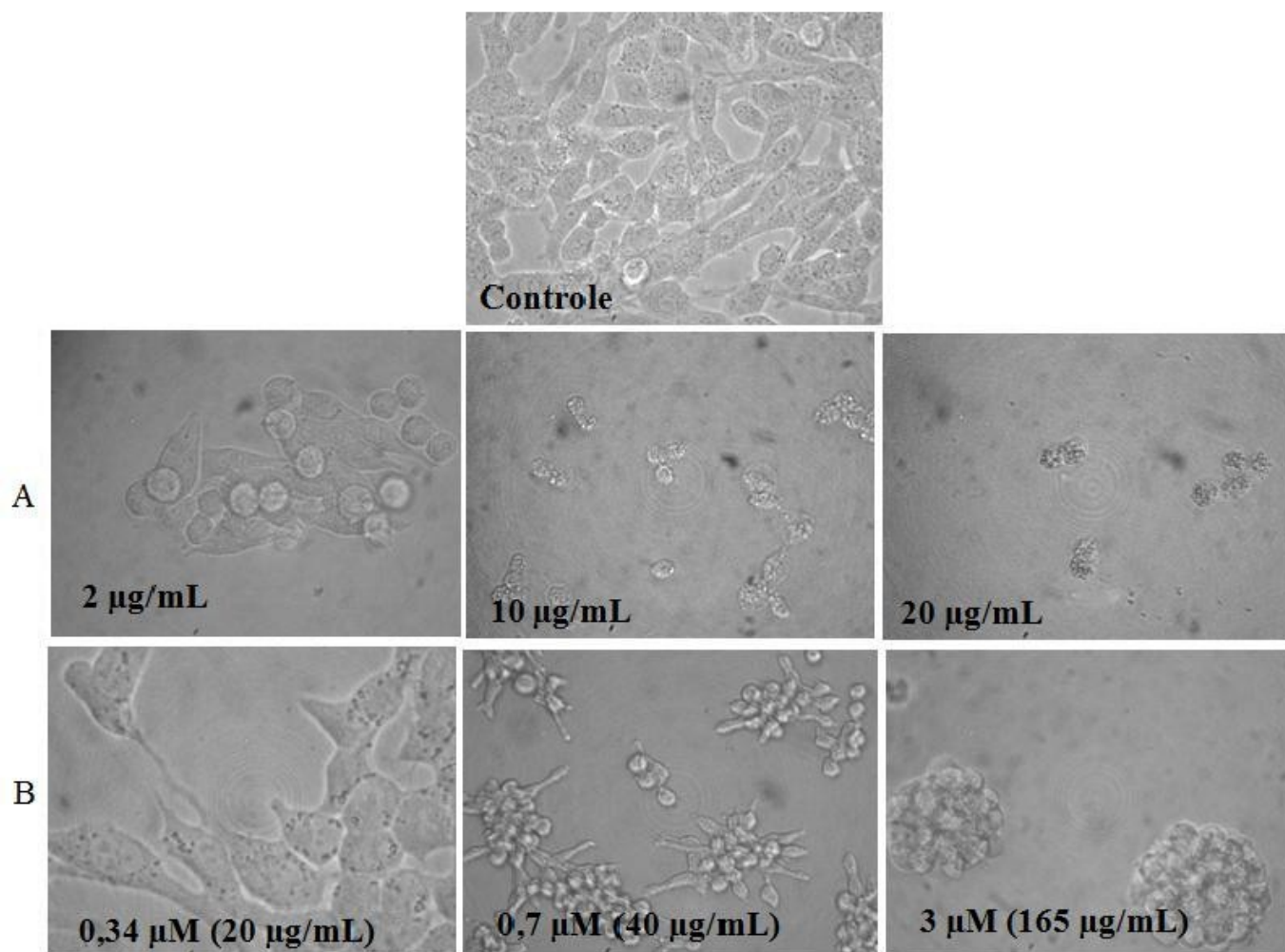


FIGURA 39 - Fotomicrografia óptica de células MCF7 tratadas com (A) PBL e (B) Leuc-B: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com PBL e Leuc-B. Imagens adquiridas em Câmera fotográfica Digital Nikon Coolpix 4500 acoplada ao MO (aumento de 400x). As células tratadas apresentaram redução do volume celular e irregularidades na membrana plasmática.

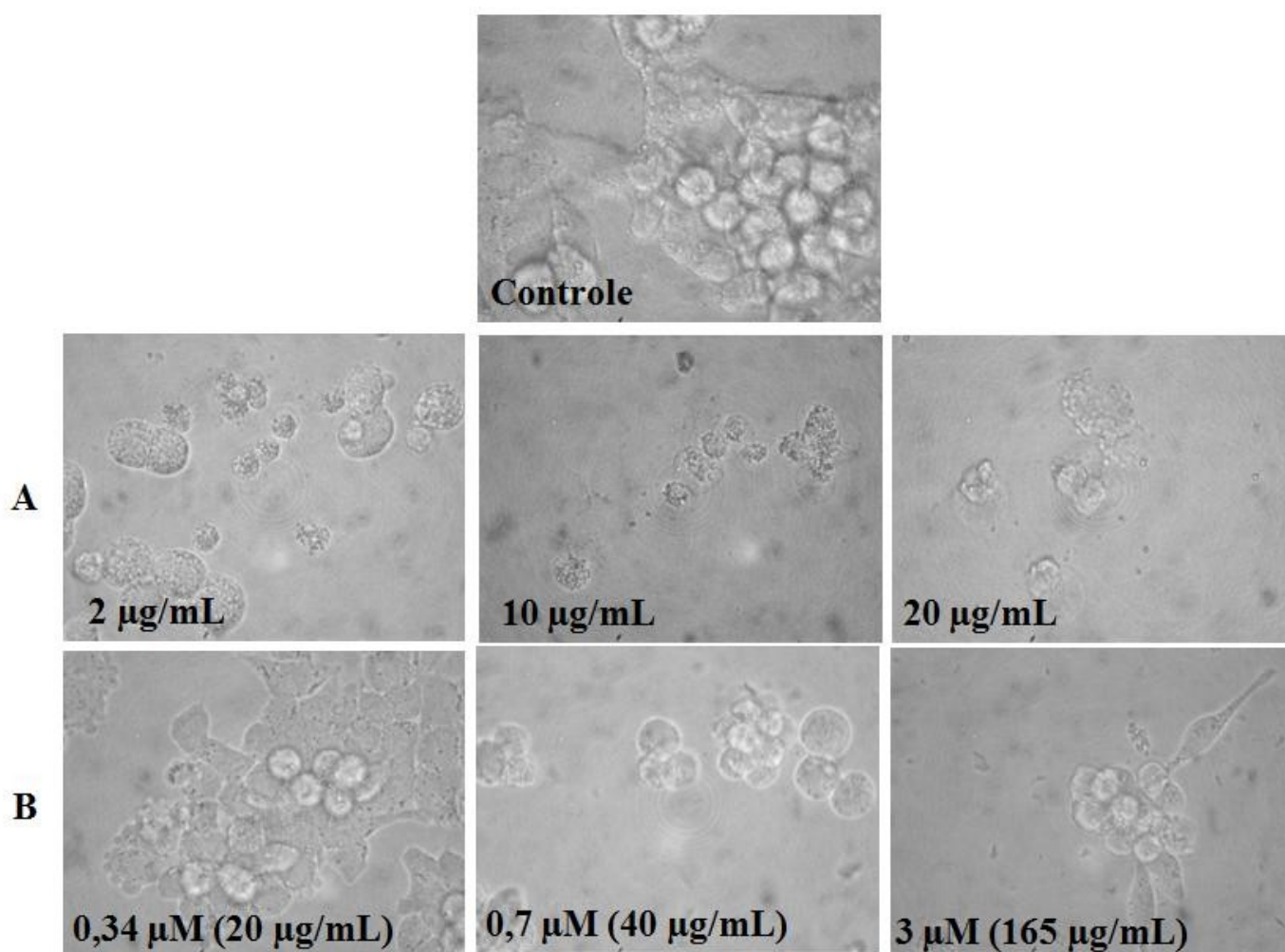


FIGURA 40 - Fotomicrografia óptica de células UACC tratadas com (A) PBL e (B) Leuc-B: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com PBL e Leuc-B. Imagens adquiridas em Câmera fotográfica Digital Nikon Coolpix 4500 acoplada ao MO (aumento de 400x). As células tratadas apresentaram redução do volume celular e irregularidades na membrana plasmática.

6.5 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DO DNA CROMOSSOMAL INDUZIDAS PELA LEUC-B ATRAVÉS DA COLORAÇÃO COM DAPI

As análises de alterações do DNA cromossomal foram realizadas por meio de coloração com DAPI. Para realização dos experimentos, as células RT2, T98, U87, CAE, MCF7 e UACC foram tratadas com Leuc-B nas concentrações 165 µg (3 µM) e 40 µg (0,7 µM), sendo esta próxima ao IC₅₀, a qual foi estabelecida previamente pelos experimentos de citotoxicidade. Após 24 horas de tratamento, foi possível visualizar a condensação da

cromatina em todas as linhagens celulares tratadas com Leuc-B. As alterações morfológicas observadas no DNA cromossomal são características do processo de morte celular programada. Os resultados são mostrados nas FIG. 41 e 42.

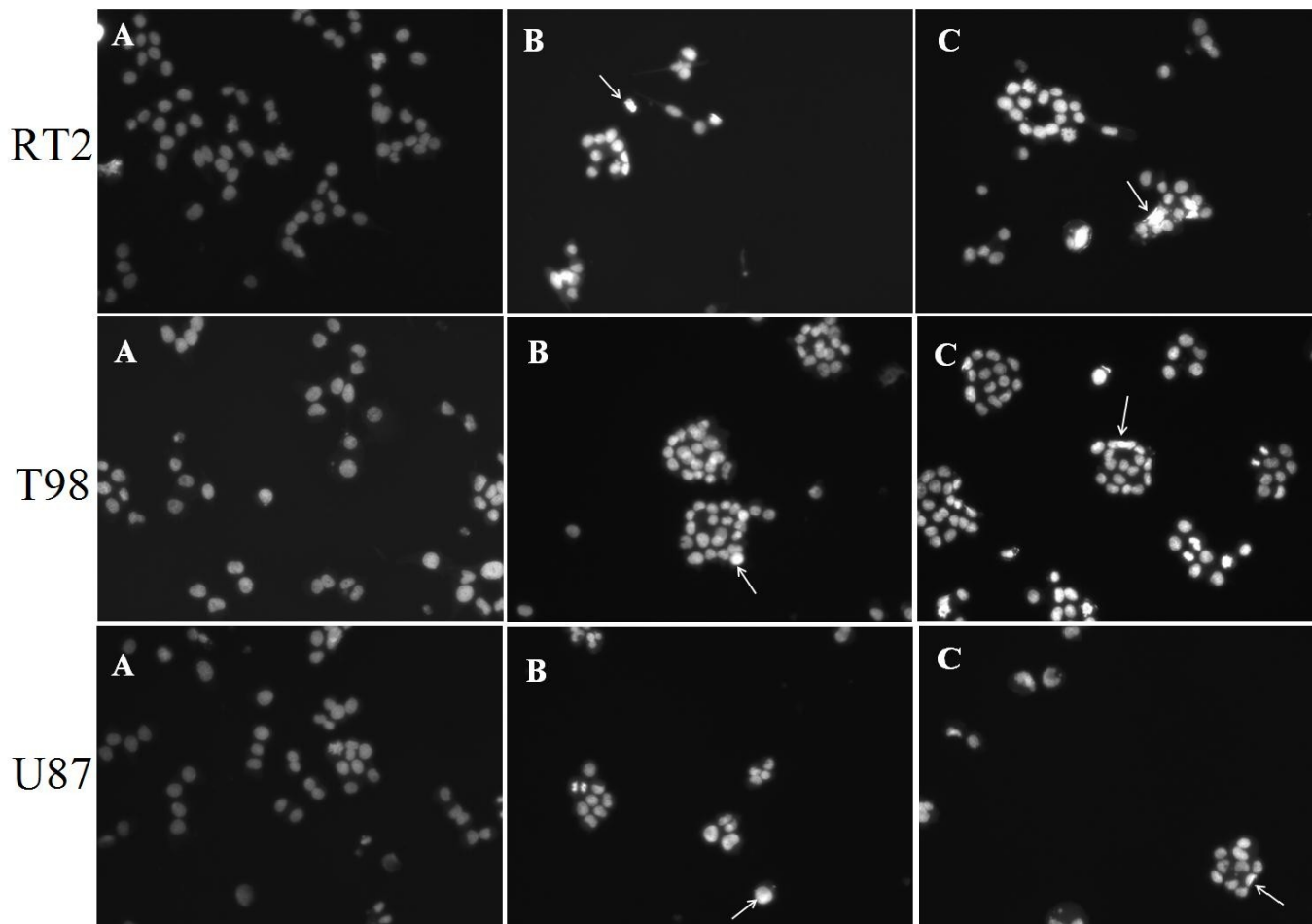


FIGURA 41 - Análise do DNA cromossomal de células RT2, T98 e U87 tratadas com Leuc-B: (A) controle, (B) 0,7 μ M de Leuc-B e (C) 3 μ M de Leuc-B. As células foram coradas com DAPI, após 24 horas de tratamento com Leuc-B. Imagens adquiridas em Câmera fotográfica Digital Nikon Coolpix 4500 acoplada ao MO (aumento de 200x). As setas indicam condensação da cromatina.

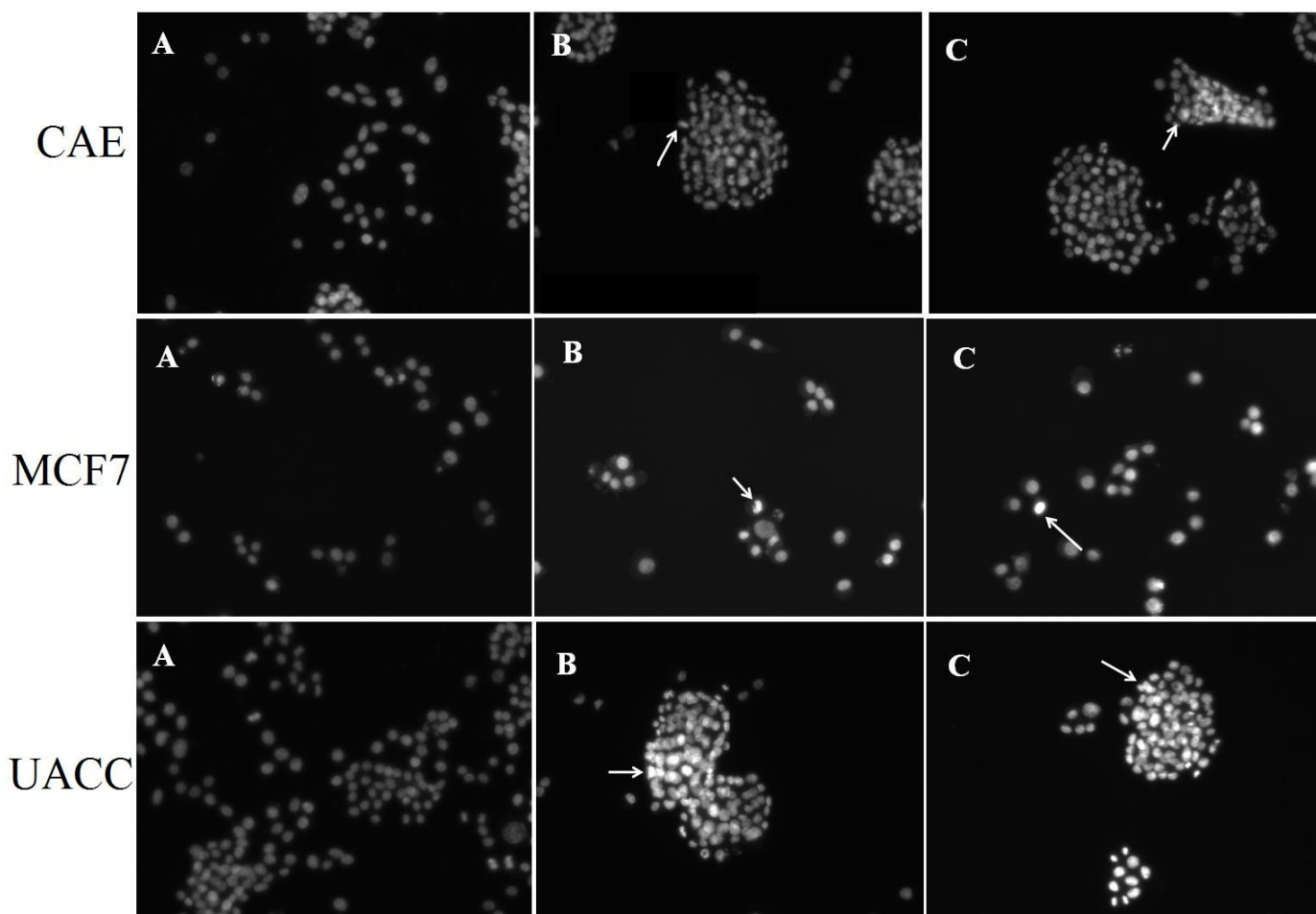


FIGURA 42 - Análise do DNA cromossomal de células CAE, MCF7, UACC tratadas com Leuc-B: (A) controle, (B) 0,7 μM e (C) 3 μM de Leuc-B. As células foram coradas com DAPI, após 24 horas de tratamento com Leuc-B. Imagens adquiridas em Câmera fotográfica Digital Nikon Coolpix 4500 acoplada ao MO (aumento de 200x). As setas indicam condensação da cromatina.

6.6 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DO DNA CROMOSSOMAL INDUZIDAS PELA LEUC-B ATRAVÉS DA COLORAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA/BROMETO DE ETÍDIO

As análises das alterações do DNA cromossomal através da coloração com laranja de acridina/brometo de etídio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram realizadas em células RT2, T98, U87, CAE, MCF7 e UACC tratadas com Leuc-B nas concentrações 165 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3 μM) e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0,7 μM), sendo esta próxima ao IC_{50} , a qual foi estabelecida previamente pelos experimentos de citotoxicidade. Após 24 horas de tratamento, o núcleo apresentou-se laranja e/ou verde com condensação e/ou fragmentação da cromatina em todas as linhagens celulares tratadas com

Leuc-B. Na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ foi possível a visualização de células com características de apoptose inicial nas linhagens celulares RT2, T98, U87, CAE, MCF7 e UACC. As alterações morfológicas observadas no DNA cromossomal das células tratadas com concentração de 165 $\mu\text{g/mL}$ são características de apoptose em fase tardia. Os resultados são mostrados nas FIG. 43 e 44. As análises foram feitas de acordo como o apêndice A.

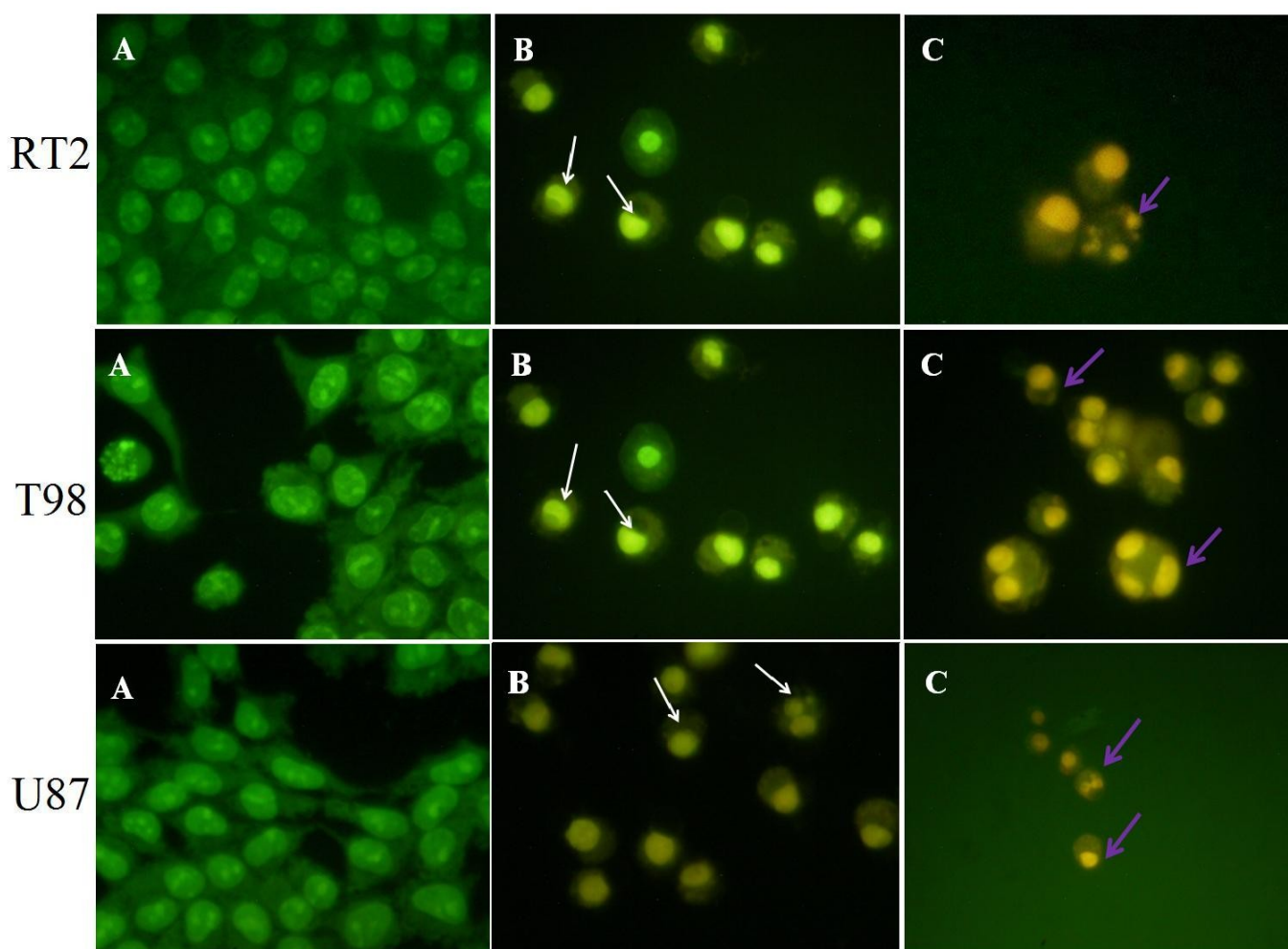


FIGURA 43 - Análise do DNA cromossomal de células RT2, T98 e U87 tratadas com Leuc-B: (A) controle, (B) 0,7 μM de Leuc-B e (C) 3 μM de Leuc-B: As células foram coradas com laranja de acridina/brometo de etídio, após 24 horas de tratamento com Leuc-B. Imagens adquiridas em Câmera fotográfica Digital Nikon Coolpix 4500 acoplada ao MO (aumento de 400x). Setas brancas indicam células em provável fase de apoptose inicial, setas roxas indicam células com características apoptóticas tardias.

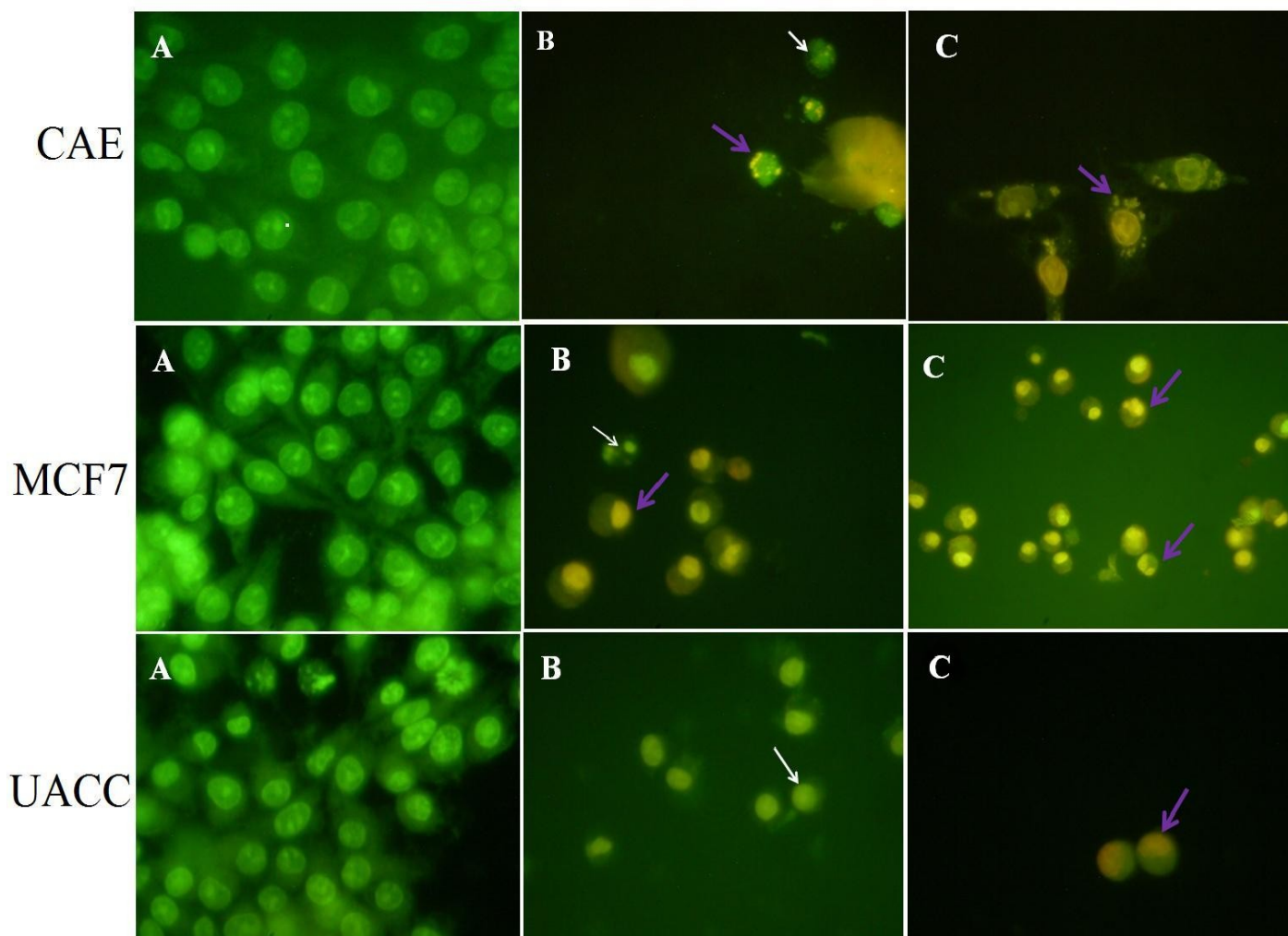


FIGURA 44 - Análise do DNA cromossomal de células CAE, MCF7 e UACC tratadas com Leuc-B: (A) controle, (B) 0,7 μ M de Leuc-B e (C) 3 μ M de Leuc-B. As células foram coradas com laranja de acridina/brometo de etídio, após 24 horas de tratamento com Leuc-B. Imagens adquiridas em Câmera fotográfica Digital Nikon Coolpix 4500 acoplada ao MO (aumento de 400x). Setas brancas indicam células em provável fase de apoptose inicial, setas roxas indicam células com características apoptóticas tardias.

6.7 SÍNTESE DA SONDA RADIOATIVA UTILIZANDO OS RADIOISÓTOPOS 125 I E 131 I

Para avaliar o perfil de biodistribuição e a capacidade de interação da Leuc-B com sítios de células tumorais *in vivo* e *in vitro*, esta enzima foi radiomarcada com 125 I, de forma a

se obter uma sonda radioativa. Da mesma forma, Leuc-B foi radiomarcada ^{131}I para obtenção de uma sonda radioativa para aquisição de imagem.

Após a radiosíntese foi possível obter uma sonda radioativa de alta atividade específica ($4,0 \times 10^{13}$ Bq/mmol) denominada ^{125}I -Leuc-B, a qual foi avaliada quanto a sua pureza radioquímica e atividade biológica. A avaliação da pureza radioquímica foi feita por cromatografia em papel Whattman nº1 e apresentou um rendimento de 71%. Após sua lavagem na resina cromatográfica DOWEX, a taxa de recuperação foi de 83%. O perfil cromatográfico é mostrado na FIG.45.

Após radiosíntese com ^{131}I , também foi possível obter uma molécula radiomarcada com alta atividade específica ($4,77 \times 10^{13}$ Bq/mmol) a qual foi chamada ^{131}I -Leuc-B. Os resultados da avaliação da pureza radioquímica por cromatografia em papel Whattman nº1 apresentou rendimento de 86% e após lavagem na resina cromatográfica DOWEX, a taxa de recuperação foi de 90,9%. O perfil cromatográfico é mostrado na FIG.46.

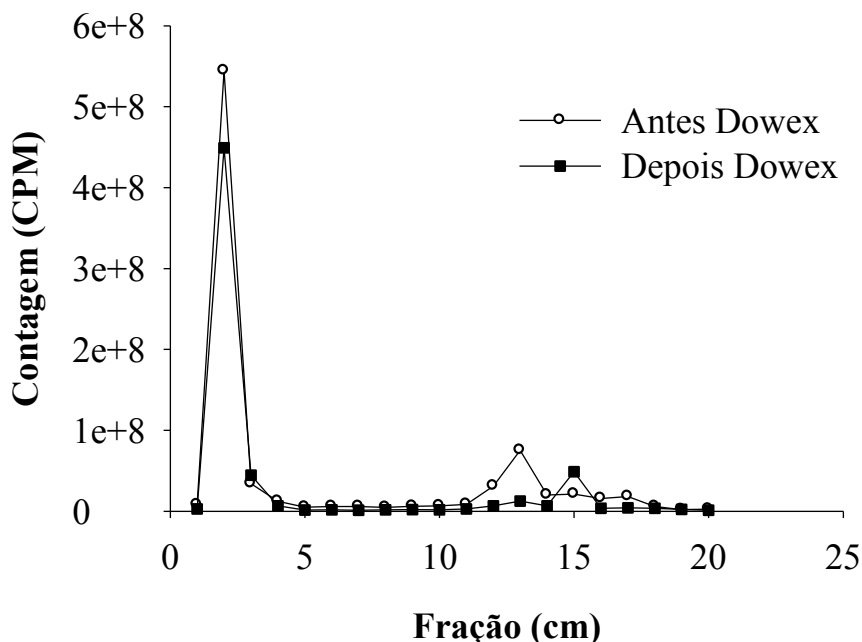


FIGURA 45 - O controle de qualidade da ^{125}I -Leuc-B, por cromatografia em papel Whatman com metanol saturado com iodeto de potássio como fase móvel. Depois da corrida, as fitas foram cortadas e a radioatividade foi medida em um contador gama com a eficiência de 82% para ^{125}I .

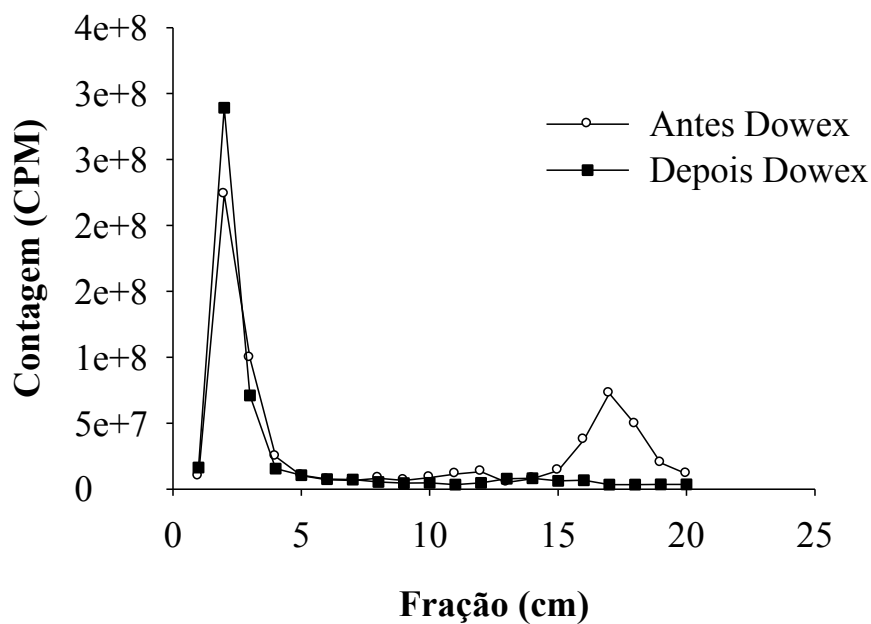


FIGURA 46 - O controle de qualidade da ^{131}I -Leuc-B, por cromatografia em papel Whatman com metanol saturado com iodeto de potássio como fase móvel. Depois da corrida, as fitas foram cortadas e radioatividade foi medida em um contador gama com a eficiência de 43% para ^{131}I .

A estabilidade da Leuc-B radiomarcada com iodo-125 foi examinada a 37 °C em soro fetal bovino. Análises quantitativas mostram a eficiência da marcação e os resultados da cromatografia em papel Whatman revelaram que a ^{125}I -Leuc-B se manteve suficientemente estável durante todo o período de incubação de 1 a 72 horas após a marcação (FIG.47).

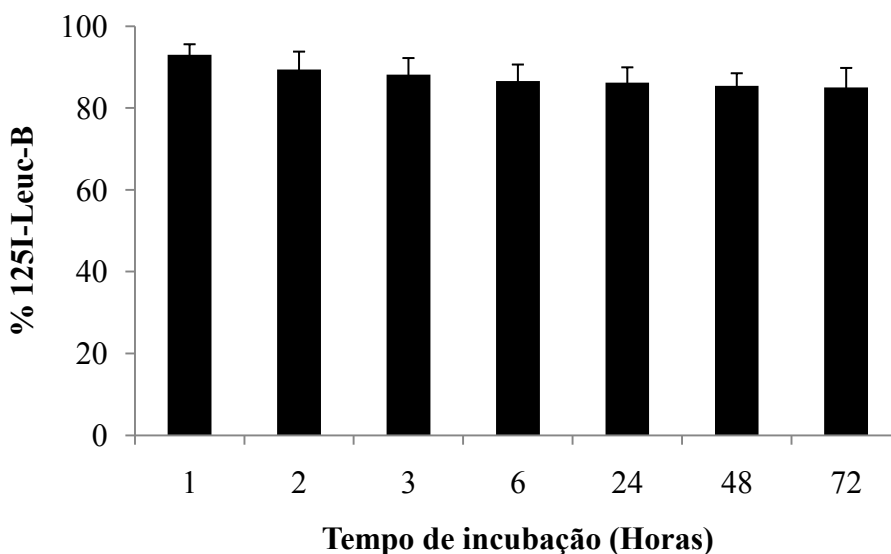


FIGURA 47 - Estudo de estabilidade em soro fetal bovino da ^{125}I -Leuc-B. Alíquotas da amostra foram submetidas ao controle de qualidade para análise por cromatografia em papel Whatman para avaliação do percentual de Leuc-B que permanecia marcada após diferentes tempos de incubação em soro.

6.8 AVALIAÇÃO DA MANUTENÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA LEUC-B IODADA.

Para avaliar a atividade biológica da molécula marcada com iodo foi realizado teste de atividade enzimática sob dimetilcaseína conforme descreveram Sanches et al, (2007). Para este ensaio, Leuc-B foi marcada com iodo estável (K^{127}I). Como controle negativo da atividade biológica da Leuc-B, a mesma foi inativada com EDTA por 30 minutos a 37°C .

O perfil da atividade enzimática encontrado da Leuc-B marcada com KI é semelhante ao perfil da enzima nativa, demonstrando que a radiossíntese não interfere na atividade biológica da Leuc-B. Os resultados são mostrados na TAB.7.

TABELA 7 - Avaliação da atividade biológica da Leuc-B marcada com iodeto estável (^{127}I)

Composto	Absorbância 340 nm	Atividade Residual (%)
Leuc-B Nativa	0,34	100
Leuc-B + EDTA	0,02	5,7 ± 0,3
Leuc-B + ^{127}I	0,32	94,2 ± 2,6

6.9 ENSAIOS DE INTERAÇÃO DA ^{125}I -LEUC-B RADIOMARCADA COM O ALVO DE AÇÃO PRESENTES NA MEMBRANA DE CÉLULAS TUMORAIS

O estudo da interação da Leuc-B com os receptores das células CAE, MCF7, T98, U87 e UACC foi feito incubando-se as células íntegras com 10^{-10} M de ^{125}I -Leuc-B na ausência (ligação total) ou presença (ligação não específica) da Leuc-B (10^{-7} M) não marcada (fria).

Os resultados obtidos mostram que Leuc-B apresenta maior ligação em sítios específicos das células de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (70%) e UACC (69%) do que nas outras linhagens. Em células MCF7, Leuc-B apresentou 66 % de ligação específica. Entre as células de glioblastomas analisadas, Leuc-B apresentou maior ligação específica na linhagem T98 (62%) do que em U87 (49%). Os resultados são mostrados na FIG. 48.

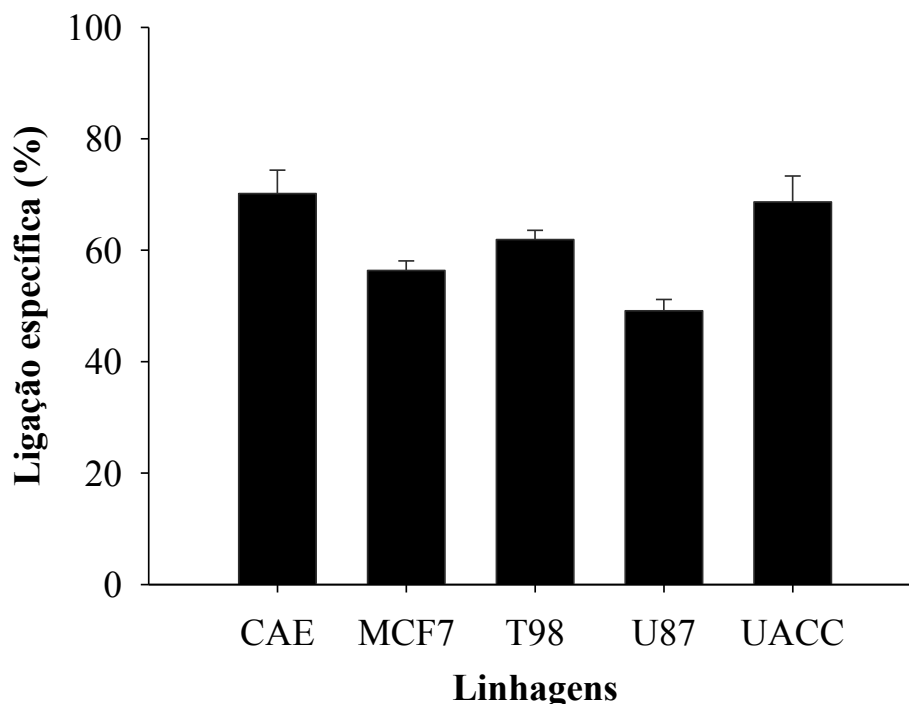


FIGURA 48 - Interação específica da ^{125}I - Leuc-B com os receptores presentes nas membranas das células tumorais CAE, MCF7, T98, UACC. A ligação específica da ^{125}I -Leuc-B mostra que Leuc-B apresenta maior ligação em sítios específicos das células de CAE e UACC (69%) do que nas outras linhagens. Leuc-B apresentou maior especificidade em células T98 do que em U87 ($P < 0,01$).

6.10 EXPERIMENTOS DE BIODISTRIBUIÇÃO E DETECÇÃO DE SÍTIOS TUMORAIS *IN VIVO*

A interação da ^{125}I -Leuc-B com células tumorais foi analisada *in vivo* para avaliar o potencial da Leuc-B radiomarcada como molde de radiofármacos para o diagnóstico de tumores. Para isso, ^{125}I -Leuc-B foi injetada via endovenosa em animais com tumor de Ehrlich para avaliação do perfil de biodistribuição e a capacidade de interação com o tumor. A cinética de biodistribuição da ^{125}I -Leuc-B esta representada na FIG. 49.

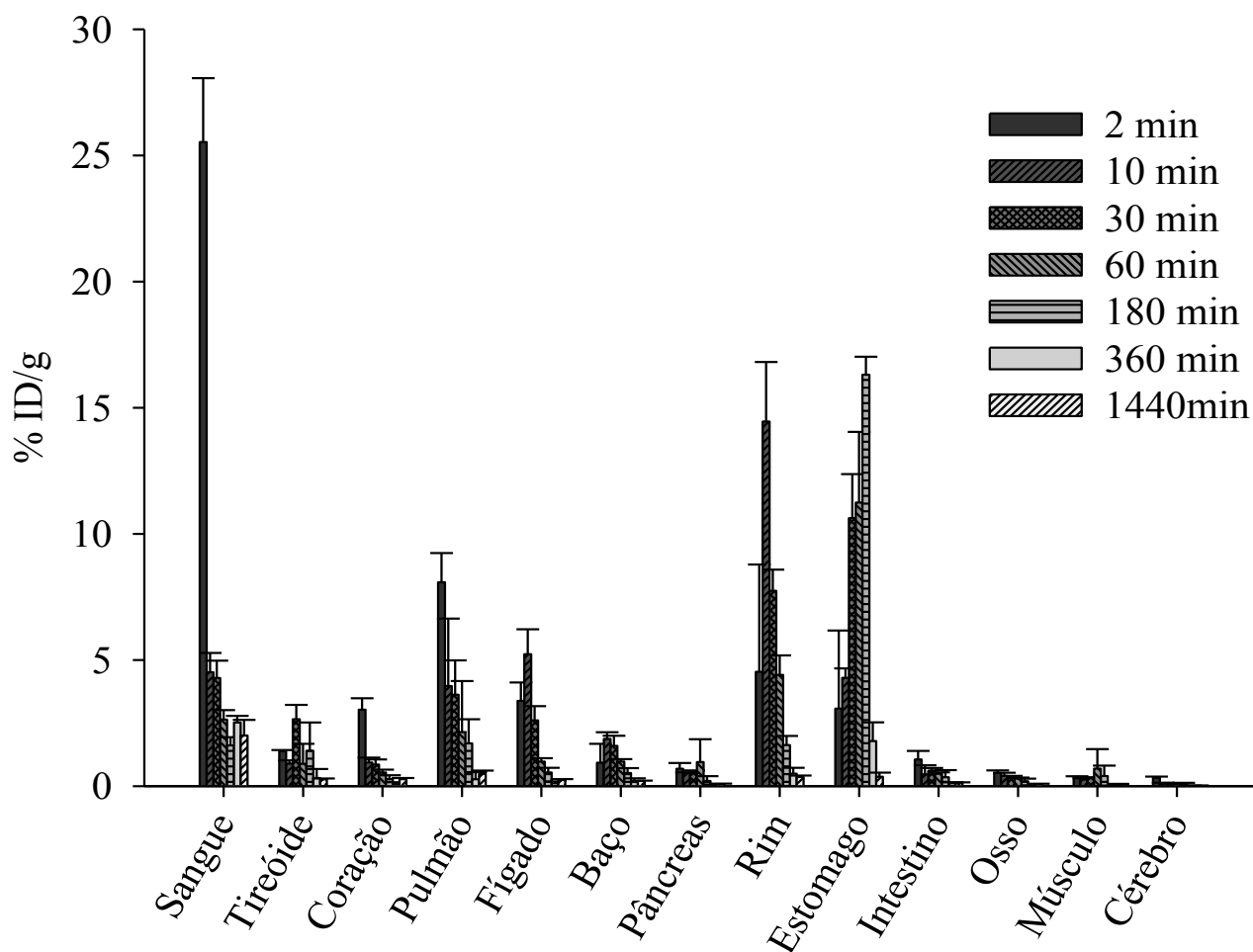


FIGURA 49 – Perfil biocinético da ¹²⁵I-Leuc-B (%DI/g) injetada via endovenosa em animais com tumor de Ehrlich.

A concentração desta molécula no sangue apresentou concentração significativa somente no tempo de 2 minutos ($25,5 \pm 2,53$ DI/g), tornando-se gradativamente menor a partir do tempo de 10 min após a injeção (FIG.50). O perfil de biodistribuição da ¹²⁵I-Leuc-B mostra um volume de distribuição de 3,40 mL/g e uma depuração plasmática rápida ($T_{1/2} = 32$ min) que pode ocorrer principalmente através dos rins após metabolização hepática. Os dados sugerem que após passagem hepática pode ocorrer desalogenação, liberando ¹²⁵I, o que explicaria um ligeiro aumento da radioatividade detectada na tireóide no tempo 30 min. A captação de ¹²⁵I-Leuc-B no coração e pulmão seguiram a cinética do sangue com subsequente redução em seus níveis 30 minutos após a injeção. A baixa captação encontrada no cérebro e cerebelo indica que a Leuc-B não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, o que torna difícil o uso dessa molécula para o tratamento sistêmico de tumores cerebrais. Houve

uma captação significativa nos rins de ^{125}I -Leuc-B, sugerindo que a Leuc-B radiomarcada é preferencialmente excretada por esse órgão. Observa-se uma captação expressiva no estômago ($12,97 \pm 5,09$ %DI/g) após 180 minutos de injeção com subsequente redução de seus níveis após 360 mim.

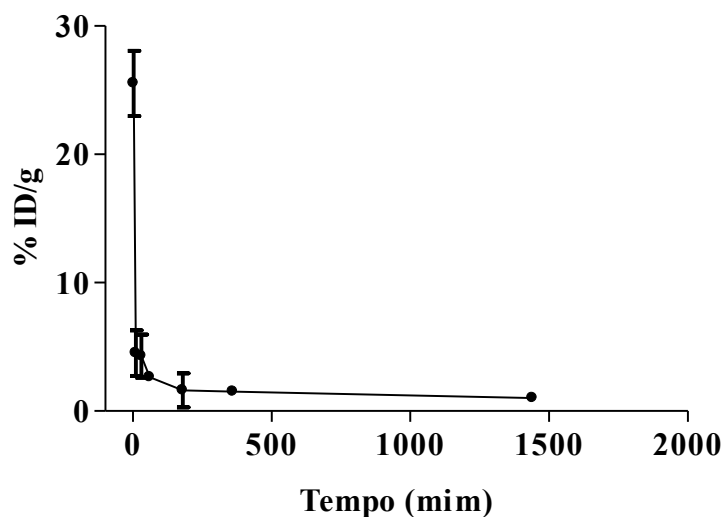


FIGURA 50 – Cinética de ^{125}I - Leuc-B no sangue de animais implantados com tumor de Ehrlich após injeção endovenosa. A concentração de ^{125}I -Leuc-B diminuiu gradativamente 10 mim após a injeção e 24 horas depois da injeção apenas uma quantidade pequena foi detectada ($T_{1/2}$: 32 min.).

A FIG.51 apresenta a comparação da concentração ^{125}I -Leuc-B na pata normal (PN) e a pata com tumor (PT). Os resultados mostram que a mesma foi significativamente captada pelo tumor já no tempo de 10 minutos após a injeção (PT: $1,71 \pm 0,41$ %DI/g) e manteve-se estável no tumor até 360 minutos após a injeção. Após 24 horas, uma concentração significativa da ^{125}I -Leuc-B ainda permanecia no tumor ($0,76 \pm 0,08$).

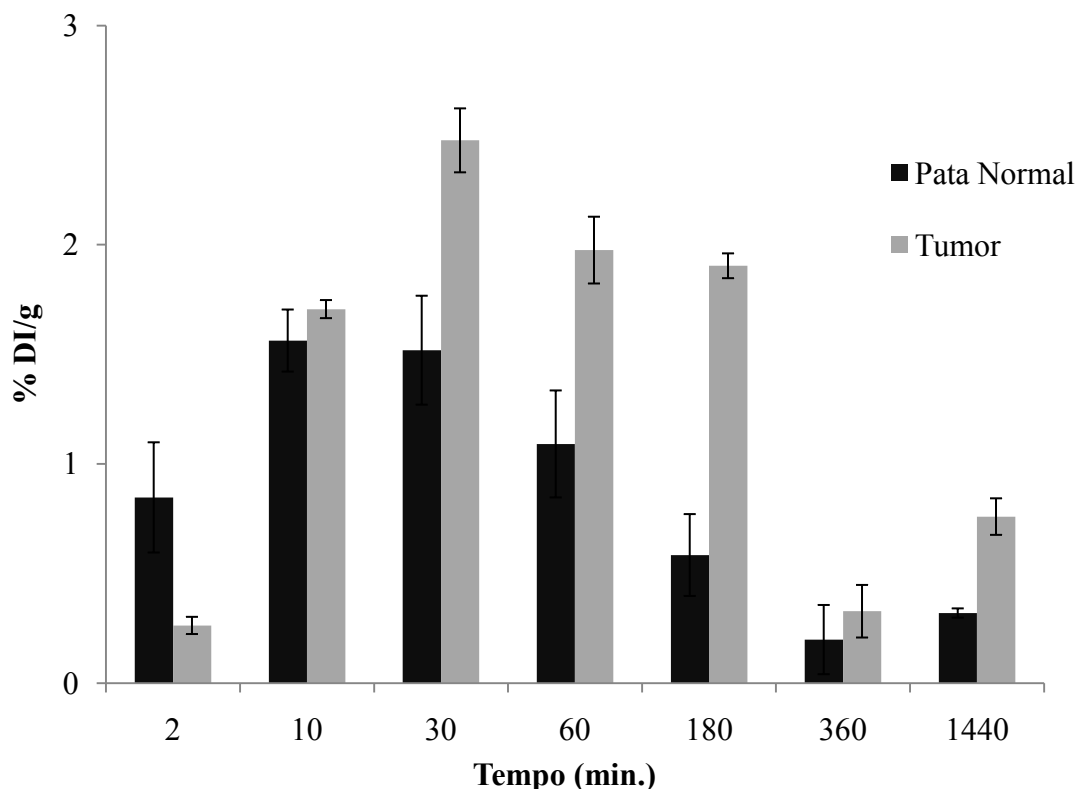


FIGURA 51 - Comparação da captação da ^{125}I -Leuc-B, no tumor de Ehrlich implantado na pata e pata normal. A concentração da ^{125}I -Leuc-B na região tumoral foi significativamente maior que na pata sem tumor nos tempos 30, 60, 180 e 1440 minutos após a injeção endovenosa caudal ($p > 0,05$).

A TAB. 8 apresenta a proporção entre a quantidade ^{125}I -Leuc-B presente no tumor e aquela presente no sangue e órgãos adjacentes ao tumor após a injeção endovenosa. As proporções encontradas demonstram que a molécula radiomarcada possui potencial para ser utilizada como molde para novos radiofármacos, uma vez que a detecção nos órgãos adjacentes não interfere na detecção ^{125}I -Leuc-B na região tumoral.

TABELA 8 - Proporção da concentração ^{125}I -Leuc-B no tumor e órgãos adjacentes após injeção endovenosa caudal

Tempo	2 min	10 min	30 min	60 min	180 min	360 min	1440 min
Tumor/PN	0,71 ± 0,39	1,15 ± 0,40	1,67 ± 0,49	1,88 ± 0,77	3,21 ± 1,49	1,33 ± 0,30	2,13 ± 0,20
Tumor/Músculo	1,24 ± 0,74	6,89 ± 2,60	7,85 ± 0,55	5,89 ± 0,45	8,82 ± 0,43	10,06 ± 0,38	9,15 ± 2,77
Tumor/Osso	0,81 ± 0,31	4,68 ± 0,60	8,12 ± 0,69	6,34 ± 2,22	7,89 ± 0,43	6,60 ± 0,18	8,31 ± 2,26
Tumor/Sangue	0,01 ± 0,01	0,38 ± 0,09	0,58 ± 0,01	0,76 ± 0,26	1,02 ± 0,05	0,13 ± 0,01	0,35 ± 0,01

Também foram realizados estudos de biodistribuição com injeções administradas por via intratumoral, de forma a avaliar possíveis alterações no perfil de biodistribuição da ^{125}I -Leuc-B. Os resultados são mostrados na FIG.52.

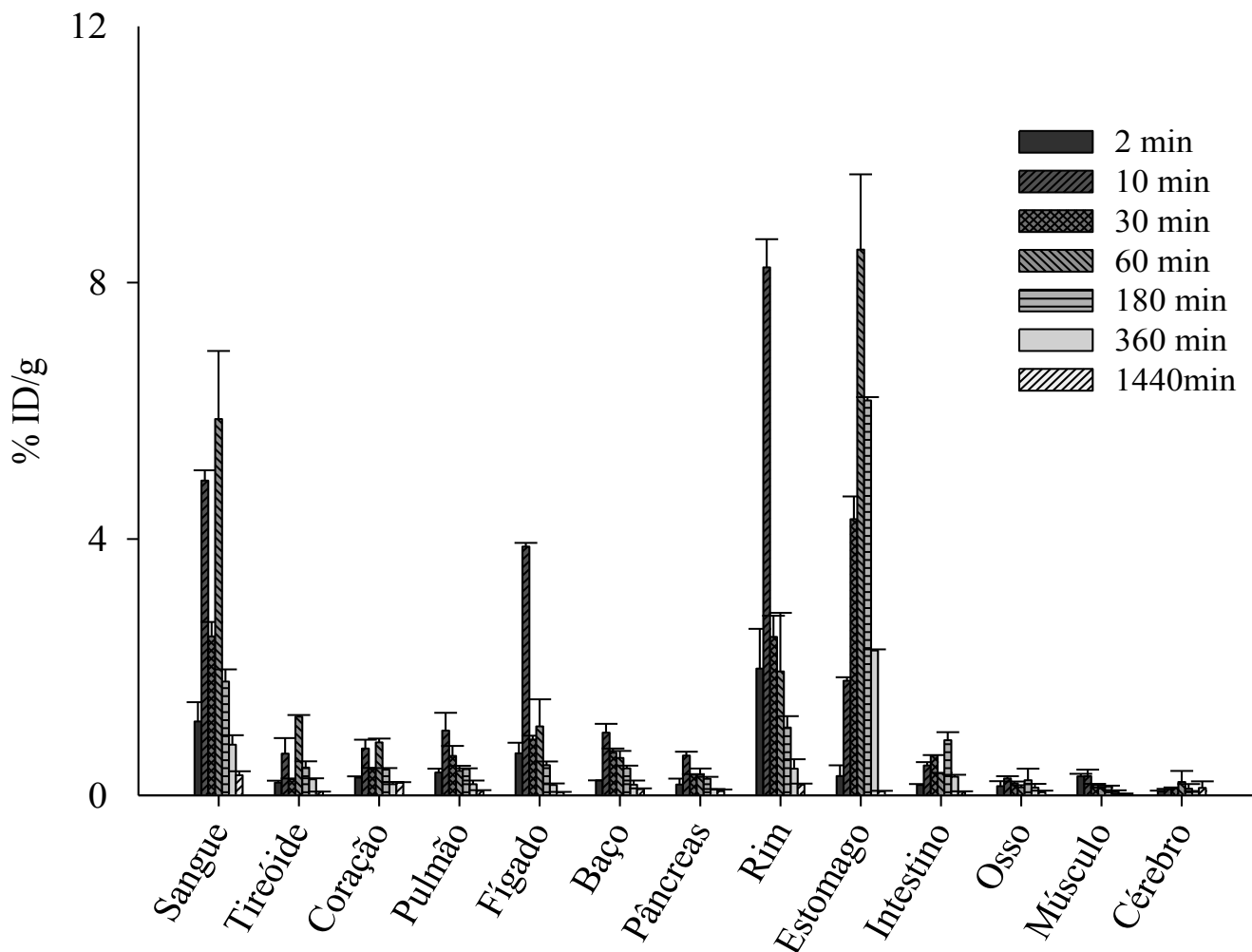


FIGURA 52 – Perfil biocinético da ^{125}I -Leuc-B (%DI/g) injetada via Intratumoral em animais com tumor de Ehrlich.

A concentração da ^{125}I -Leuc-B no sangue aumentou com o tempo, chegando a $5,87 \pm 1,50$ DI/g no tempo de 60 minutos após a injeção. A captação desta molécula no coração e pulmão seguiu a cinética do sangue, porém os valores foram menores quando comparados aos valores da biodistribuição via endovenosa. A captação renal também foi reduzida passando de $14,45 \pm 2,32$ na via endovenosa para $8,23 \pm 0,62$ %DI/g na administração intratumoral, no tempo de 10 minutos. A captação no osso e no músculo foi semelhante à captação via endovenosa. Houve também uma alta captação no estômago após 60 min de injeção ($7,18 \pm 4,55$ %DI/g), mas com valores menores que a injeção endovenosa.

A injeção via intratumoral foi capaz de aumentar os níveis ^{125}I -Leuc-B na região tumoral com redução dos níveis em órgãos não tumorais, o que resultará certamente em menor toxicidade para o paciente. Após 60 minutos da injeção, $45,50 \pm 6,65$ %DI/g da molécula ainda permanecia no tumor como mostra a FIG.53.

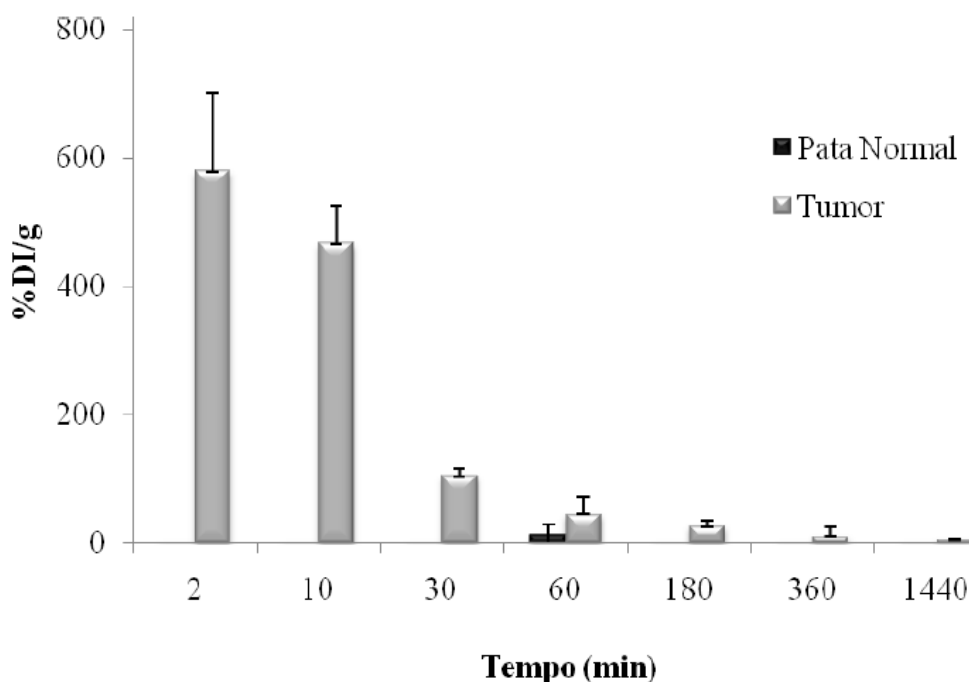


FIGURA 53 - Comparação da captura da ^{125}I -Leuc-B no tumor de Ehrlich implantado e pata normal. A concentração da ^{125}I -Leuc-B na região tumoral foi significativamente maior que na pata sem tumor em todos os tempos após a injeção intratumoral ($p < 0,05$).

Para analisar melhor a interação *in vivo* da ^{125}I -Leuc-B com sítios tumorais foi feita uma competição com $0,048 \mu\text{g/mL}$ ($8,72 \times 10^{-10}$ M) de ^{125}I -Leuc-B na ausência (ligação total) ou presença (ligação não específica) da Leuc-B não marcada $4,8 \mu\text{g/mL}$ ($8,72 \times 10^{-8}$ M). Primeiramente foi feita uma competição injetando-se via endovenosa um pool contendo a ^{125}I -Leuc-B mais a Leuc-B (fria) não marcada. Posteriormente realizou uma competição em que a ^{125}I -Leuc-B foi injetada via endovenosa e a Leuc-B fria foi injetada intratumoral. Nesse estudo de competição foram avaliados: sangue, urina, tireóide, rins, músculo, pata normal, pata com tumor, sendo que a maioria desses órgãos avaliados apresentou captura alterada pela presença de um excesso de Leuc-B não marcada. Os resultados são mostrados na TAB.9 e 10.

TABELA 9 - Competição endovenosa da ^{125}I -Leuc-B (%ID/g) em animais implantados com tumor de Ehrlich

Órgão	Tempo (min)	^{125}I - Leuc-B	^{125}I - Leuc-B + Leuc-B Fria*
Sangue	30	4,28 ± 0,68	2,52 ± 0,17
	60	2,63 ± 0,37	1,80 ± 0,40
	180	1,61 ± 0,32	1,07 ± 0,21
Tireóide	30	2,65 ± 0,56	1,62 ± 0,35
	60	0,77 ± 0,07	1,06 ± 0,40
	180	1,08 ± 0,03	0,60 ± 0,04
Coração	30	0,85 ± 0,20	0,44 ± 0,03
	60	0,54 ± 0,11	0,36 ± 0,05
	180	0,28 ± 0,01	0,20 ± 0,03
Pulmão	30	3,62 ± 1,35	0,95 ± 0,30
	60	2,13 ± 0,01	0,71 ± 0,25
	180	1,69 ± 0,09	1,06 ± 0,28
Fígado	30	2,60 ± 0,56	1,41 ± 0,31
	60	0,97 ± 0,12	0,66 ± 0,07
	180	0,54 ± 0,18	0,30 ± 0,11
Baço	30	1,59 ± 0,39	1,06 ± 0,06
	60	0,97 ± 0,09	0,66 ± 0,03
	180	0,51 ± 0,09	0,32 ± 0,04
Rins	30	7,74 ± 0,83	2,32 ± 0,40
	60	4,40 ± 0,77	1,42 ± 0,21
	180	1,62 ± 0,36	0,90 ± 0,09
Estômago	30	9,28 ± 3,05	3,39 ± 1,61
	60	11,24 ± 2,8	6,02 ± 2,26
	180	12,97 ± 5,09	3,40 ± 1,38
Intestino	30	0,61 ± 0,10	0,72 ± 0,21
	60	0,48 ± 0,06	0,41 ± 0,13
	180	0,35 ± 0,28	0,30 ± 0,16
Osso	30	0,32 ± 0,07	0,17 ± 0,03
	60	0,31 ± 0,02	0,16 ± 0,07
	180	0,19 ± 0,15	0,10 ± 0,03
Músculo	30	0,31 ± 0,03	0,09 ± 0,01
	60	0,69 ± 0,07	0,11 ± 0,02
	180	0,38 ± 0,04	0,05 ± 0,01
Cérebro	30	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01
	60	0,08 ± 0,02	0,05 ± 0,01
	180	0,07 ± 0,05	0,03 ± 0,01
Tumor	30	2,47 ± 0,04	1,03 ± 0,05
	60	1,97 ± 0,52	0,76 ± 0,11
	180	1,90 ± 0,05	1,18 ± 0,22

* Injeção endovenosa do pool contendo ^{125}I -Leuc-B e Leuc-B fria em excesso 100 x.

TABELA 10 - Competição da ^{125}I -Leuc-B (%ID/g) em animais implantados com tumor de Ehrlich

Órgão	Tempo (min)	^{125}I - Leuc-B	^{125}I - Leuc-B + Leuc-B Fria*
Sangue	10	4,51 ± 0,77	4,61 ± 1,28
	30	4,28 ± 0,68	2,74 ± 0,09
	60	2,63 ± 0,32	1,77 ± 0,40
Tireóide	10	0,89 ± 0,12	1,33 ± 0,18
	30	2,65 ± 0,50	0,83 ± 0,11
	60	0,71 ± 0,07	0,62 ± 0,02
Coração	10	0,92 ± 0,19	0,91 ± 0,27
	30	0,86 ± 0,20	0,44 ± 0,01
	60	0,51 ± 0,11	0,40 ± 0,05
Pulmão	10	3,96 ± 0,67	1,20 ± 0,28
	30	3,64 ± 1,35	0,71 ± 0,09
	60	2,14 ± 0,01	0,80 ± 0,13
Fígado	10	5,22 ± 0,91	4,52 ± 0,86
	30	2,60 ± 0,58	1,47 ± 0,27
	60	0,97 ± 0,12	0,74 ± 0,03
Baço	10	1,87 ± 0,21	1,50 ± 0,23
	30	1,59 ± 0,37	1,56 ± 0,12
	60	14,49 ± 2,21	3,34 ± 0,58
Rins	10	7,74 ± 0,84	2,84 ± 0,21
	30	4,47 ± 0,77	1,97 ± 0,25
	60	4,29 ± 0,37	1,34 ± 0,70
Estômago	10	9,28 ± 3,05	3,39 ± 1,61
	30	11,24 ± 2,8	6,02 ± 2,26
	60	0,66 ± 0,15	0,28 ± 0,08
Intestino	10	0,61 ± 0,10	0,72 ± 0,21
	30	0,48 ± 0,06	0,41 ± 0,13
	60	0,40 ± 0,12	0,16 ± 0,06
Osso	10	0,32 ± 0,08	0,27 ± 0,12
	30	0,31 ± 0,02	0,20 ± 0,04
	60	0,25 ± 0,04	0,14 ± 0,05
Músculo	10	0,31 ± 0,03	0,16 ± 0,05
	30	0,69 ± 0,07	0,13 ± 0,03
	60	0,11 ± 0,01	0,08 ± 0,04
Cérebro	10	0,07 ± 0,02	0,09 ± 0,02
	30	0,08 ± 0,02	0,05 ± 0,00
	60	1,70 ± 0,41	0,94 ± 0,06
Tumor	10	2,47 ± 0,04	1,22 ± 0,18
	30	1,97 ± 0,52	0,99 ± 0,24
	60		

*Injeção endovenosa da ^{125}I -Leuc-B e injeção intratumoral Leuc-B fria em excesso 100 x.

Não houve diferença significativa na biodistribuição de competição via endovenosa (pool de Leuc-B fria + ^{125}I -Leuc-B) da biodistribuição endovenosa-intratumoral (^{125}I -Leuc-B injetada via endovenosa e Leuc-B fria injetada via intratumoral). Em ambas Leuc-B foi capaz de descolar a ^{125}I -Leuc-B (50%). O resultado é mostrado no FIG. 54.

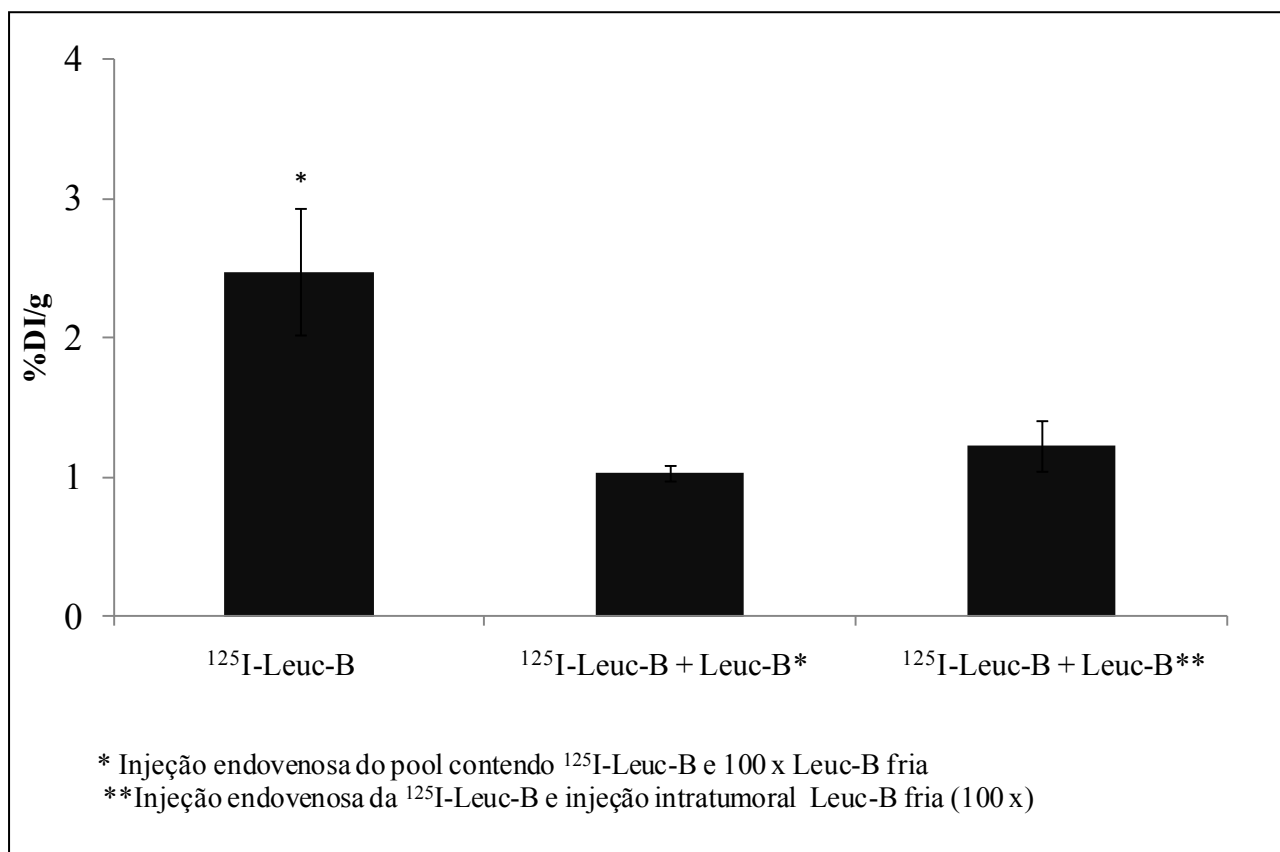


FIGURA 54 - Estudo de competição *in vivo* da ^{125}I - Leuc-B em camundongos com tumor de Ehrlich. Competição avaliada após 30 minutos de injeção. Um bloqueio de cerca de 50% da ligação da Leuc-B radiomarcada foi observado (n=3; *p< 0,05).

Na TAB. 11 esta representada a proporção entre a quantidade ^{125}I -Leuc-B presente no tumor e aquela presente no sangue e órgãos adjacentes ao tumor deste ensaio de competição.

TABELA 11 - Proporção da concentração da ^{125}I -Leuc-B (%ID/g) no tumor e órgãos adjacentes

	Tempo (min)	^{125}I - Leuc-B	^{125}I - Leuc-B + Leuc-B Fria*	^{125}I - Leuc-B + Leuc-B Fria**
Tumor/pata normal	10	1,15 ± 0,40	ND	1,90 ± 038
	30	1,67 ± 0,49	2,20 ± 0,14	1,76 ± 0,50
	60	1,88 ± 0,77	1,56 ± 0,25	1,86 ± 0,71
	180	3,21 ± 1,49	2,94 ± 0,63	ND
Tumor/musculo	10	6,89 ± 2,60	ND	7,47 ± 2,61
	30	7,85 ± 0,55	11,3 ± 1,06	8,53 ± 1,71
	60	5,89 ± 0,45	6,35 ± 1,51	8,49 ± 1,29
	180	8,82 ± 0,43	17,23 ± 6,68	ND
Tumor/osso	10	4,68 ± 0,60	ND	6,32 ± 3,22
	30	8,12 ± 0,69	6,49 ± 0,68	5,36 ± 1,64
	60	6,34 ± 2,22	4,31 ± 1,23	5,29 ± 0,86
	180	7,89 ± 0,43	10,81 ± 1,83	ND
Tumor/sangue	10	0,38 ± 0,09	ND	0,21 ± 0,08
	30	0,58 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,44 ± 0,06
	60	0,76 ± 0,26	0,43 ± 0,02	0,56 ± 0,07
	180	1,02 ± 0,05	1,12 ± 0,22	ND

* Injeção endovenosa do pool contendo ^{125}I -Leuc-B e Leuc-B fria em excesso 100 x

**Injeção endovenosa da ^{125}I -Leuc-B e injeção intratumoral Leuc-B fria em excesso 100 x

ND: Não Determinado

6.11 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL USO DA ^{131}I -LEUC-B PARA RADIODIAGNÓSTICO NA MEDICINA NUCLEAR

A aquisição de imagem foi feita com uma sonda radioativa de ^{131}I -Leuc-B injetada via endovenosa caudal e com injeção intratumoral em camundongos Swiss fêmeas inoculados com tumor de Ehrlich.

As imagens foram obtidas nos tempos 3 e 24 horas após a injeção endovenosa caudal de 7,4 MBq de ^{131}I -Leuc-B. A imagem realizada com injeção intratumoral de ^{131}I -Leuc-B (1,2 MBq) foi adquirida nos tempos 3, 24 e 72 horas.

As imagens ventrais de corpo inteiro foram adquiridas por 15 minutos em Gama Câmara G&E Healthcare Millenium. Após 72 horas ^{131}I -Leuc-B ainda permanece ligada ao tumor em quantidade significativa. Os resultados são mostrados nas FIG. 55, 56 e 57.

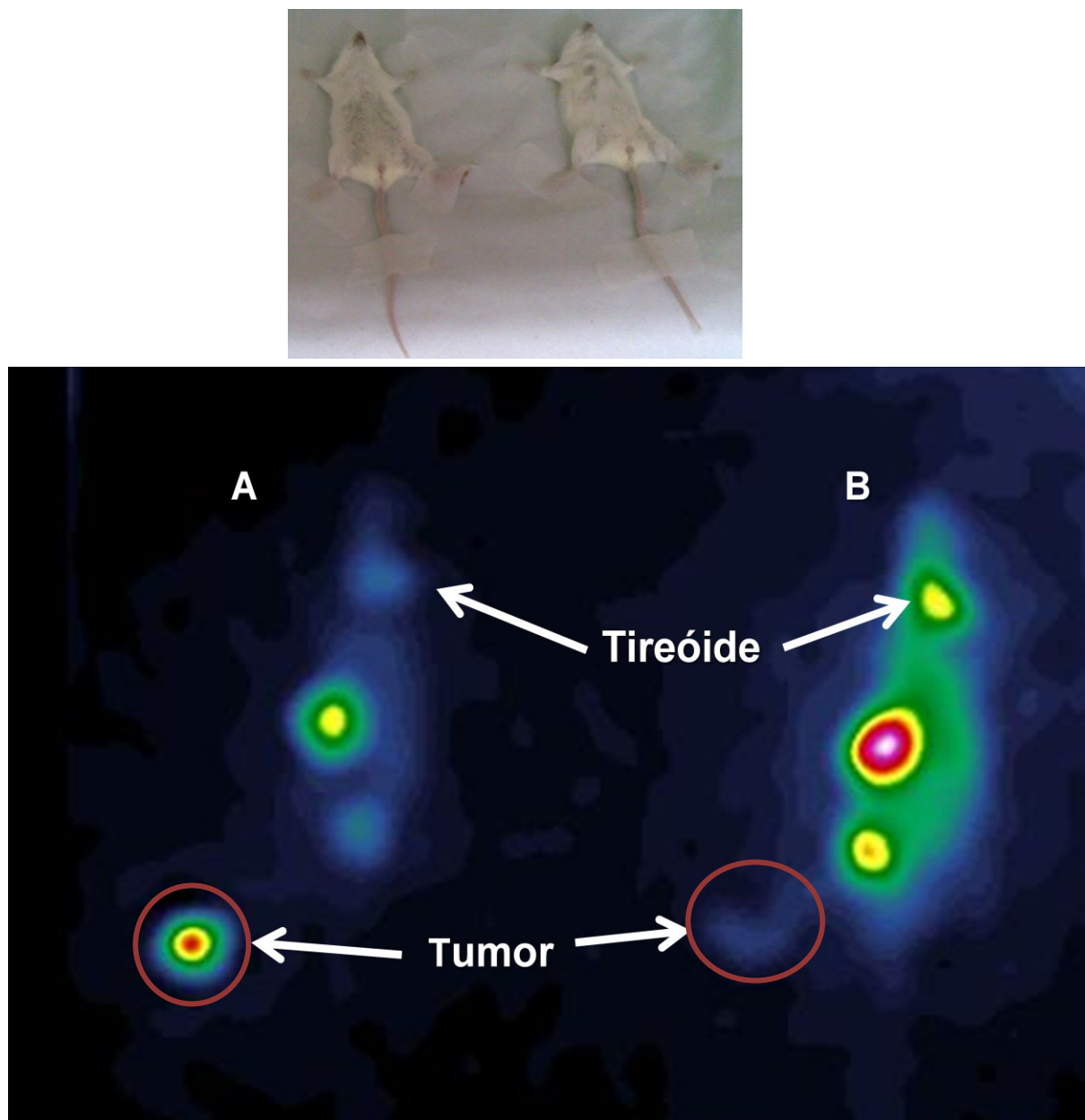


FIGURA 55 - Imagem planar de corpo inteiro de camundongos implantados com tumor de Ehrlich. As imagens foram adquiridas após 3 horas da injeção de ^{131}I -Leuc-B: (A) injeção intratumoral (1,2 MBq), (B) injeção endovenosa (7,4 MBq). Apenas a pata com tumor foi detectada na cintilografia. As áreas hipercaptantes na região abdominal são vias de excreção da molécula. A captação na tireóide provavelmente é devido ao I livre, produto de hidrólise que ocorre por enzimas específicas.

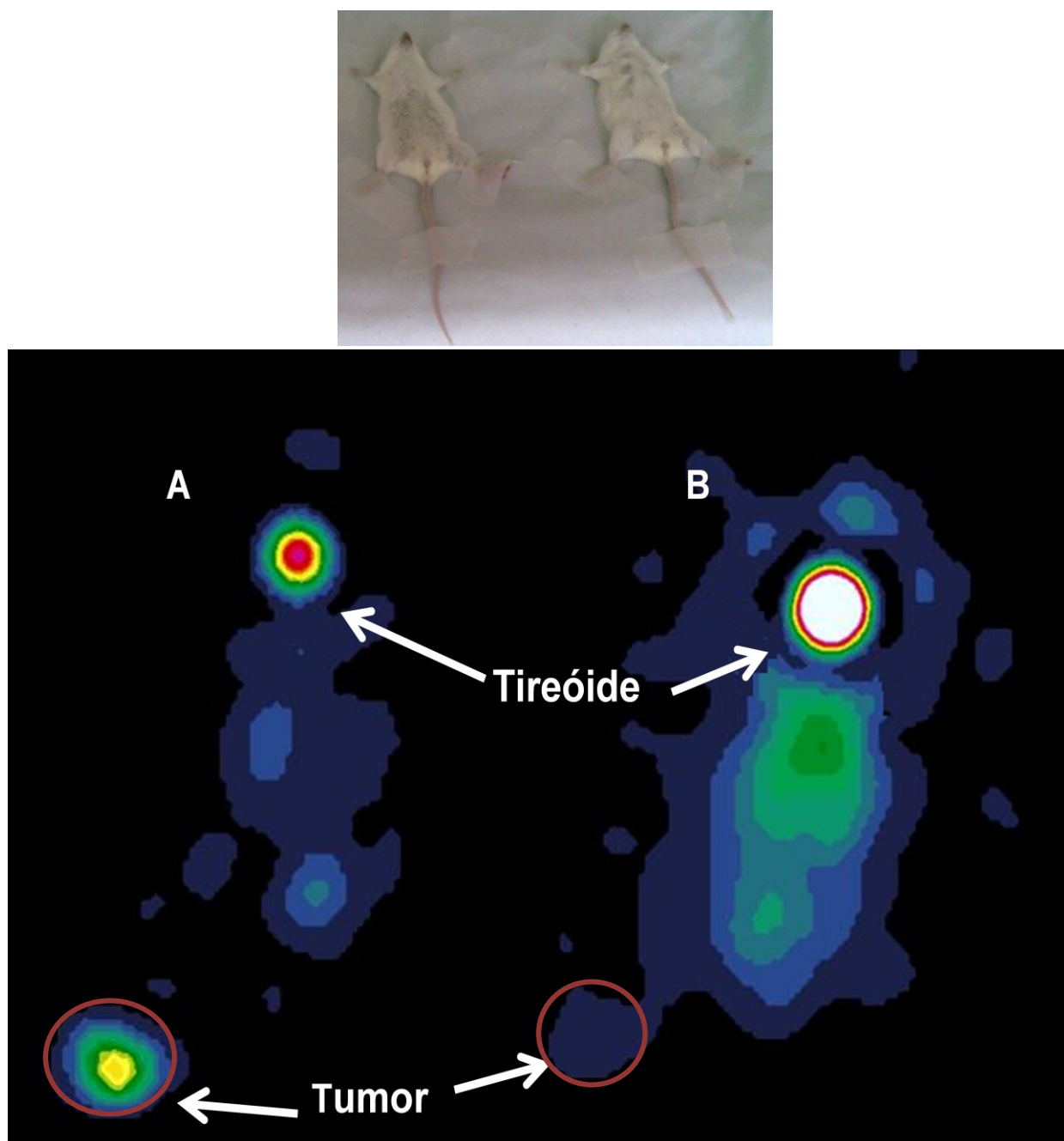


FIGURA 56 - Imagem planar de corpo inteiro de camundongos implantados com tumor de Ehrlich. As imagens foram adquiridas após 24 horas da injeção de ^{131}I -Leuc-B: (A) injeção intratumoral (1,2 MBq), (B) injeção endovenosa (7,4 MBq). Apenas a pata com tumor foi detectada na cintilografia. As áreas hipercaptantes na região abdominal são vias de excreção da molécula. A captação na tireóide provavelmente é devido ao I livre, produto de hidrólise que ocorre por enzimas específicas.

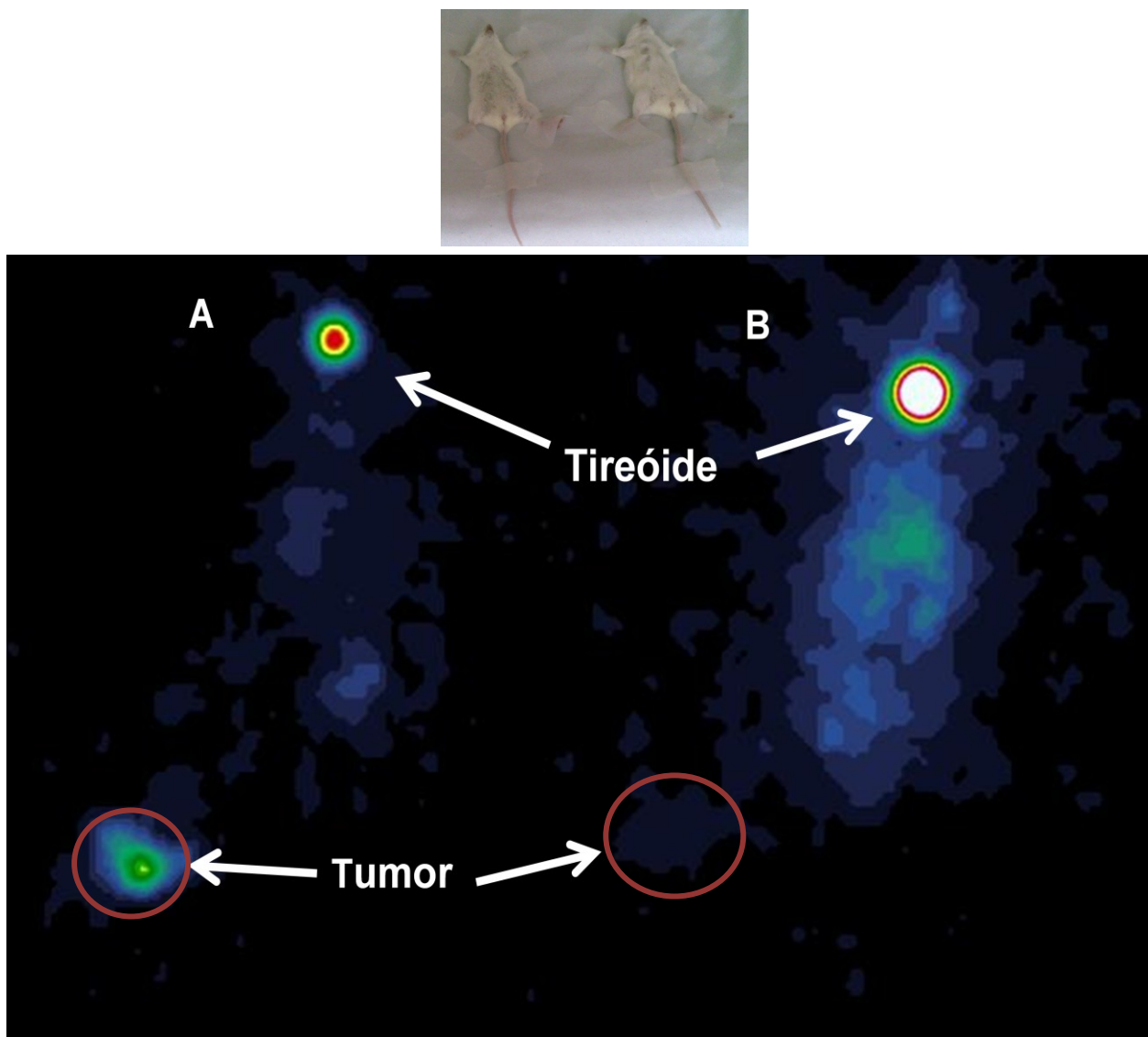


FIGURA 57 -- Imagem planar de corpo inteiro de camundongos implantados com tumor de Ehrlich. As imagens foram adquiridas após 72 horas da injeção intratumoral de: (A) ^{131}I -Leuc-B (1,2 MBq) e (B) Iodo 131 puro. Apenas a pata com tumor foi detectada na cintilografia. As áreas hipercaptantes na região abdominal são vias de excreção da molécula. A captação na tireóide provavelmente é devido ao I livre, produto de hidrólise que ocorre por enzimas específicas.

7 DISCUSSÃO

Segundo a organização mundial da saúde (2006) o câncer é a segunda causa de morte na maior parte do mundo, ficando atrás apenas das mortes por problemas cardiovasculares. As estimativas são de que 12,5 % das mortes no mundo sejam em decorrência do câncer.

Para que seja feito um tratamento adequado e eficiente é necessário um diagnóstico rápido e precoce. Apesar dos esforços, as formas de diagnóstico atuais são deficientes na detecção de estágios iniciais de tumores, devido à inespecificidade dos fármacos e dos quimioterápicos disponíveis. Muitos avanços têm sido conseguidos também no tratamento das neoplasias, mas muitas destas terapias matam tanto as células tumorais quanto as células normais, causando muitos efeitos colaterais.

Técnicas de diagnóstico por imagem que permitem obter informações moleculares funcionais a respeito do tumor são atraentes para o diagnóstico precoce. No entanto, os radiofármacos mais utilizados para o diagnóstico de câncer apesar de serem específicos, não são seletivos para tumores, podendo gerar resultados falso-positivos. O agente tumoral mais comumente usado em PET é ^{18}F -Fluordesoxiglicose (FDG), porém pode se ligar especificamente a órgãos de alta taxa metabólica e fluxo sanguíneo devido a um processo inflamatório, gerando, assim, um diagnóstico falso (LOMEÑA & SOLER, 2005). Por este motivo é necessária a busca por novos agentes tumorais capazes de se ligar especificamente a marcadores tumorais, para que se possa obter um diagnóstico mais preciso e precoce dos tumores malignos.

Devido a superexpressão de algumas integrinas em tumores como a integrina $\alpha_v\beta_3$, freqüentemente expressa em neuroblastomas, glioblastomas, melanomas e carcinomas de pulmão, mama, próstata e bexiga, estas proteínas são marcadores tumorais interessantes. Essa evidência clínica indica que estas integrinas podem ser excelentes alvos terapêuticos no tratamento do câncer já que a inibição destas moléculas suprime eficientemente a angiogênese e inibe a progressão do tumor (ALGHISI & RUEGG, 2006).

O potencial antitumoral de compostos presentes no veneno de serpente com domínio desintegrina e desintegrina-*like* tem sido demonstrado em vários estudos. Trabalhos recentes mostraram que as desintegrinas contortrostatina, salmosina (KANG, LEE & KIM, 1999) e jararagina (ECD-desintegrina) (CORRÊA et al, 2002) causam alterações morfológicas nas células tumorais, inibindo a adesão e a metástase, além de promover alterações nas propriedades biológicas das células tumorais. Outra desintegrina isolada do veneno da serpente *Echis carinatus*, a echistatina, inibe fortemente a ligação da vitronectina com a integrina $\alpha_v\beta_3$ (MCLANE et al, 1996) e é capaz de se ligar à integrina $\alpha_v\beta_3$ expressa em osteoclastos (KUMAR et al, 1997). Estes resultados sugerem que as desintegrinas podem inibir a adesão de células tumorais à matriz extracelular por competição com receptores específicos.

Embora o potencial antitumoral da peçonha de várias serpentes tenha sido demonstrado nos últimos anos, o potencial terapêutico dos componentes de *B.leucurus* contra as neoplasias malignas ainda permanece inexplorado. Desta forma, o presente estudo representa uma investigação pioneira das possíveis propriedades antitumorais desta peçonha, bem como da enzima purificada (Leuc-B).

Neste trabalho, Leuc-B foi avaliada como antitumoral devido ao seu domínio desintegrina, o qual pode interagir com as integrinas. A Leucorolisina-B, isolada da peçonha de *B. leucurus*, foi obtida em estado homogêneo de acordo com Sanchez et al, 2007 e suas principais propriedades antitumorais e farmacológicas elucidadas.

Leuc-B é uma SVMP de classe III (~55 kDa), zinco-dependente, apresentando domínio HEXXHXXGXXH. Esta proteína, após tratamento com EDTA, perde sua atividade enzimática (SANCHES et al, 2007). Os resultados também mostram intensa atividade proteolítica dessa metaloproteinase em diversas moléculas da matriz extracelular, resultando na perda de adesão da mesma ao seu substrato e alterando sua morfologia (SANCHEZ et al, (2007).

Culturas de células tumorais têm se mostrado excelentes modelos para o desenvolvimento de experimentos *in vitro* que visam avaliar as alterações de crescimento e proliferação celular, e estabelecer os mecanismos pelos quais tais mudanças ocorrem.

Assim, neste estudo, foi avaliado o efeito antitumoral da Leuc-B (ECD-desintegrina) em diferentes linhagens de células tumorais. A potência antitumoral da Leuc-B foi avaliada obtendo-se os valores da concentração do composto que produziu 50% de morte celular (IC_{50}). Foi demonstrado que Leuc-B possui efeito citotóxico dose-dependente em todas as células tumorais testadas. Os experimentos também mostraram que a Leuc-B foi significativamente mais citotóxica para as linhagens RT2, Ehrlich e MCF7 do que para as células U87, T98 e UACC. A partir dos dados, ficou claro que com o aumento da concentração de Leuc-B, o número de células viáveis diminuiu consideravelmente. Após 48 horas de tratamento com 3 μ M de Leuc-B houve 98% de mortalidade das células. Leuc-B foi mais citotóxica para células MCF7 ($IC_{50} = 0,45 \mu$ M) do que a cisplatina ($IC_{50} = 4 \mu$ M), um agente quimioterápico usado clinicamente para o tratamento de tumores (YDE & ISSINGER, 2006).

Tem sido relatado que diversas malignidades estão relacionadas com a superexpressão de integrinas na superfície celular. Estes resultados também mostram que antagonistas de integrinas podem fornecer uma nova abordagem terapêutica para o tratamento de tumores (KUMAR et al, 1997).

Acredita-se que Leuc-B seja capaz de se ligar a receptores específicos expressos na membrana das células tumorais e inibir a adesão das mesmas à matriz extracelular levando as células à morte. No entanto, ainda precisa ser avaliado se este efeito antitumoral é devido à inibição de integrinas ou se é devido ao domínio desintegrina-*like* presente na Leuc-B.

A sobrevivência da maioria das células requer adesão das mesmas à matriz extracelular. A perda da interação célula-matriz extracelular resulta na morte dessas células por apoptose (CACCAMO et al, 2004). Receptores de integrina podem mediar várias funções, incluindo a prevenção da apoptose induzida pela desadesão das células à MEC. Logo, antagonistas de integrinas podem desencadear uma via de sinalização de apoptose (BONFOCO et al, 2000).

Após tratadas com Leuc-B, as células apresentaram alterações morfológicas, tais como: redução de volume citoplasmático, protusões da membrana plasmática, fragmentação e/ou condensação da cromatina. Tais alterações observadas pós o tratamento sugerem a morte celular por apoptose.

As células coradas com DAPI, após 24 horas de tratamento com Leuc-B, apresentaram condensação da cromatina e esta alteração morfológica observada é característica de apoptose. Mesmo nas linhagens mais resistentes ao tratamento foi possível identificar essas mudanças.

O DAPI é um ensaio rápido e fácil para a avaliação da apoptose. No entanto, este método tem uma limitação: somente é capaz de detectar aumento dos sinais apoptóticos (RIBBLE et al, 2005) e não é específico para detecção dos eventos iniciais da apoptose, podendo detectar, também, outros mecanismos de morte. Por este motivo, as alterações morfológicas das células também foram analisadas através da coloração com o laranja de acridina e o brometo de etídio.

O laranja de acridina, um corante catiônico, tem sido objeto de extensos estudos nos últimos anos por causa de suas propriedades metacromáticas (BEERS, 1964) e pode ser usado em conjunto com brometo de etídio para diferenciar entre células vivas e apoptóticas.

Através da análise das alterações do DNA cromossomal pela coloração com LA/BE foi possível observar que o núcleo das células ficou laranja ou verde com condensação e/ou fragmentação da cromatina em todas as linhagens de células tratadas com Leuc-B. Na concentração de 0,7 μM foi possível visualizar as células com prováveis características de apoptose inicial. As alterações morfológicas observadas no DNA cromossômico das células tratadas com a concentração de 3 μM são típicas de apoptose em fase tardia.

Novos estudos estão em desenvolvimento a fim de avaliar se essa morte é devido ao domínio desintegrina-*like* presente em Leuc-B, assim como outros testes, por exemplo: citometria de fluxo, coloração com anexina/PI, testes para detecção de caspases devem ser

realizados para determinar com maior precisão o mecanismo de morte celular desencadeado pela Leuc-B.

De forma a aprofundar os estudos e investigar o potencial farmacológico de Leuc-B, foi padronizado a sua radiomarcagem. Uma sonda radioativa (^{125}I -Leuc-B) de alta eficiência (83%) e atividade específica satisfatória ($4,0 \times 10^{13}$ Bq/mmol) foi sintetizada. A ^{125}I -Leuc-B foi utilizada nos estudos de interação *in vitro* e *in vivo* e a ^{131}I -Leuc-B para a detecção de tumor através da imagem SPECT.

Os estudos de interação *in vitro* demonstraram que Leuc-B foi capaz de se ligar a sítios específicos presentes na membrana de todas as linhagens de células tumorais testadas. Leuc-B apresentou maior especificidade para células CAE e UACC. Essa interação pode ser devido à presença de receptores de integrinas na membrana celular, o que torna a Leuc-B uma candidata atrativa para ser utilizada como molde de fármaco para o tratamento de tumores. Entretanto, se estes receptores específicos para ^{125}I -Leuc-B presentes nestes tumores envolvem integrinas ainda precisa ser avaliado e estes estudos estão em desenvolvimento no laboratório de radiobiologia-CDTN.

Para avaliar o perfil de biodistribuição e a capacidade de interação com tumores *in vivo*, ^{125}I -Leuc-B foi administrada via endovenosa em animais com tumor de ehrlich.

O perfil de biodistribuição da ^{125}I -Leuc-B indica depuração rápida do sangue ($t_{1/2}$: 32 mim) que pode ocorrer principalmente através dos rins após metabolização hepática. A captação de ^{125}I -Leuc-B em outros órgãos abdominais, exceto o estômago, seguiu a cinética do sangue e tornou-se insignificante 10 minutos após a injeção.

A alta captação no estômago pode estar associada à desalogenação que ocorre *in vivo*. Esta desiodação está relacionada, provavelmente, com a interface de ligação do iodo na proteína. A incorporação do iodo nos resíduos de tirosina das proteínas torna os mesmos bastante semelhantes estruturalmente aos hormônios da tireóide, que são passíveis de desalogenação pela ação de enzimas específicas. Uma solução para este problema seria a

radiodação pela via indireta, com a utilização de um grupo prostético não fenólico que diminuiria a desalogenação do composto *in vivo* (ZALUTSKY & NARULA, 1987).

O acúmulo de ^{125}I -Leuc-B na tireóide é relativamente baixo sugerindo que a molécula radiomarcada provavelmente não foi fortemente hidrolisada durante a passagem hepática e estomacal, sendo sua estrutura molecular mantida intacta.

A baixa captação da molécula pelo cérebro indica que a ^{125}I -Leuc-B dificilmente atravessa a barreira hemato-encefálica, o que torna difícil o uso desta molécula para o tratamento sistêmico de tumores cerebrais. Uma alternativa para este problema seria o encapsulamento da Leuc-B radiomarcada em nanoveículos como lipossomas. Estas moléculas têm características lipofílicas que lhes permitem atravessar a barreira hemato-encefálica, com a vantagem de reduzir os efeitos tóxicos da molécula encapsulada (FREITA & FREZARD, 1997).

Houve captação significativa da ^{125}I -Leuc-B na região tumoral, sendo que a molécula radiomarcada se manteve em altas proporções no tumor mesmo após 24 horas após a administração. A ^{125}I -Leuc-B, além de interagir com tumor de Ehrlich, foi capaz de distinguir o tumor dos tecidos saudáveis, já que não houve captação substancial nos órgãos adjacentes ao tumor, tais como: osso e músculo.

A manutenção da ligação da Leuc-B ao tecido tumoral, mesmo após 24 horas, é um ponto positivo, pois permitirá sua detecção mesmo após uma redução drástica dos níveis da molécula no sangue e outros órgãos adjacentes ao tumor. Isso fará com que o *background* seja menor durante a aquisição da imagem e permitirá uma detecção mais precisa dos sítios tumorais.

A administração da droga por injeção direta na região tumoral tem sido muito estudada nos últimos anos, no entanto, é pouco utilizada na clínica provavelmente devido à natureza invasiva da administração e à necessidade do conhecimento da localização exata do tumor. Porém, estes estudos são muito importantes, já que através da administração intratumoral de drogas pode-se determinar alterações no perfil de distribuição e captação dos

fármacos, além de avaliar a possibilidade da fabricação de fármacos para aplicação tópica (LAMMERS, et al, 2006).

Segundo Shen et al, (2005), a vantagem da administração intratumoral do radiofármaco é que desta forma a radiação pode agir mais intensa e localmente, sem que os órgãos vizinhos sadios sejam significativamente irradiados.

A administração intratumoral da ^{125}I -Leuc-B elevou os níveis da molécula no tumor e seu tempo de residência na região tumoral. A alta captação nos rins mostra que a via de excreção da mesma é feita por este órgão. A captação no sangue aumentou até o tempo de 60 minutos, após este tempo diminuiu gradativamente a valores insignificantes. A captação da ^{125}I -Leuc- B no coração e pulmão seguiu a cinética do sangue e foi menor que a incorporação da ^{125}I -Leuc-B injetada via endovenosa. Tais resultados mostram que a via de administração da Leuc-B altera seu perfil de biodistribuição.

Para analisar a interação da Leuc-B com sítios tumorais específicos foi realizada uma competição *in vivo* com 0,48 $\mu\text{g/mL}$ ($8,72 \times 10^{-10}$ M) de ^{125}I -Leuc-B na ausência (ligação total) ou presença (ligação não específica) da Leuc-B não marcada 4,8 $\mu\text{g/mL}$ ($8,72 \times 10^{-8}$ M). A competição foi feita em camundongos implantados com tumor de Ehrlich, injetando-se via endovenosa um pool contendo a ^{125}I -Leuc-B mais a Leuc-B fria. Foi realizada também uma competição em que a ^{125}I -Leuc-B foi injetada via endovenosa e a Leuc-B fria foi injetada intratumoral.

Os resultados obtidos mostram que não houve diferença significativa no perfil de biodistribuição, considerando as vias de administração da droga. No entanto, foi possível observar que houve interação da Leuc-B com sítios específicos no tumor, além disso Leuc-B foi capaz de descolar a ^{125}I -Leuc-B em aproximadamente 50%.

Resultados obtidos nos estudos de biodistribuição da ^{125}I -Leuc-B demonstraram o potencial da ^{125}I -Leuc-B para detectar sítios tumorais. Por isso, uma avaliação preliminar do uso da Leuc-B para detecção de tumores por imagem foi feita com uma sonda radioativa de

^{131}I -Leuc-B injetada via endovenosa caudal e com injeção intratumoral em camundongos Swiss fêmeas inoculados com tumor Ehrlich.

A radiosíntese com ^{131}I permitiu a obtenção de uma molécula radiomarcada com um rendimento de 90,9% e alta atividade específica ($4,77 \times 10^{13}$ Bq/mmol), a qual foi suficiente para formação de imagem SPECT.

A imagem do tumor foi realizada com sucesso em todos os animais. A imagem SPECT planar demonstrou acumulação significativa da ^{131}I -Leuc-B no tumor 3 horas após injeção e mesmo após 24 horas, com injeção endovenosa, a Leuc-B ainda permanecia no tumor. Como pode ser observado a partir da imagem, ^{131}I -Leuc-B foi principalmente excretada pelos rins, fígado e baço. Este estudo fornece uma base para a aplicação da Leuc-B para o diagnóstico de tumores.

Os resultados obtidos indicam que a Leuc-B apresenta-se como uma molécula-molde promissora para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou radiofármacos para o tratamento e diagnóstico das neoplasias malignas.

8 CONCLUSÃO

Leuc-B apresentou atividade citotóxica contra células de tumores RT2, T98, U87, Ehrlich, MCF7 e UACC. Os resultados demonstraram que a Leuc-B é capaz de reduzir drasticamente o número de células tumorais viáveis. Este mecanismo de morte celular sugere morte por apoptose. Logo, o domínio desintegrina-*like* de Leuc-B pode ser útil para realizar novas experiências, visando uma melhor compreensão do mecanismo de ação dessa toxina. O mecanismo de morte induzido pela Leuc-B também pode ter sido desencadeado por Anoikis.

Neste trabalho foi possível sintetizar uma sonda radioativa utilizando os radioisótopos $^{125/131}\text{I}$ ($^{125/131}\text{I}$ -Leuc-B), com alta eficiência e alta atividade específica, preservando sua atividade biológica. Também foi demonstrada pela primeira vez *in vivo* a interação da ^{125}I -Leuc-B com tumores sólidos. A caracterização da interação revelou que pode haver sítios específicos para Leuc-B nas células tumorais estudadas.

Os resultados indicam que Leuc-B é uma molécula promissora para detecção de sítios tumorais *in vivo* pela técnica SPECT e podendo ser um protótipo importante no desenvolvimento de peptídeos pequenos com propriedades mais favoráveis. Considerando-se outros radioisótopos de iodo que emitem pósitrons (^{124}I), pode ser possível projetar um análogo da Leuc-B marcado com este radiotraçador para imagens PET.

Todos os resultados indicam o uso potencial de Leuc-B como um modelo para o desenvolvimento de drogas e/ou radiofármacos para diagnóstico e tratamento de tumores malignos.

9 PERPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar se o efeito citotóxico da Leuc-B sobre as células tumorais é devido ao seu domínio desintegrina-*like*.
- Determinar o mecanismo de morte celular desencadeado pela Leuc-B.
- Caracterizar os receptores específicos da Leuc-B presentes nas células tumorais estudadas.
- Avaliar a interação da Leuc-B com integrinas presentes na membrana das células tumorais.
- Avaliar a competição da Leuc-B com receptores específicos envolvidos com a adesão das células à matriz extracelular.
- Avaliar a toxicidade da Leuc-B, *in vitro* e *in vivo*, em tecidos normais e animais saudáveis, respectivamente.
- Avaliar a eficácia do uso da Leuc-B radiomarcada com traçadores emissores de pósitrons para detectar sítios tumorais através de estudos de imagem PET *in vivo*.
- Sintetizar um análogo da Leuc-B próximo ao domínio desintegrina-*like* e avaliar seu potencial antitumoral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGERO, U., ARANTES, R., LACERDA-QUEIROZ, N., MESQUITA, O., MAGALHÃES, A., SANCHEZ, E. Effect of mutalysin II on vascular recanalisation after thrombosis induction in the ear of the hairless mice model. **Toxicon**, 50, pp. 698-706, 2007.

ALGHISI, G. C., RUEGG, C. Vascular integrins in tumor angiogenesis: mediators and therapeutic targets. **Endothelium- J. Endothelial Cell Res.**,13, pp. 113-135. 2006.

ANZETTI, M. C., MELO, P. S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocam Pesquisa**, 1, pp. 37-58, 2007.

AVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Radiofarmacos. Acesso em 2 de fevereiro de 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>.

BAPTISTA, R. G. Integrins, cancer and snake venom toxins (mini review). **J.Venom Animal Toxins incl.Trop. Dis.**, 11, pp. 217-241, 2005.

BARCELLOS, N. M. Farmacocinética -Faculdade de Farmacia da UFMG. Acesso em 28 de Novembro de 2009. Disponível em Farmacocinetica: <http://www.farmacia.ufmg.br>.

BAUER, J., VARNER, J., SCHREINER, C., KORNBERG, L., NICKOLAS, R., JULIANO, R. Functional role of cytoplasmic domain of the integrin $\alpha 5$ subunit. **J.Cell.Biol.**, 122, pp. 209-221,1993.

BEERS, R. F. Acridine orange binding by micrococcus lysodeikticus. **Journal of Bacteriology**, 88, pp. 1249-1256, 1964.

BERNARD, A., JACQUES-SILVA, M. C., LENZ, G.. Abordagem molecular no desenvolvimento de fármacos anti-tumorais. **Infarma**, 15, pp. 9-10, 2003.

BJARNASON, J., & FOX, J. Snake venom metalloendopeptidases: reprolysins. **Methods Enzymol**, 248, pp. 345-368, 1995.

BONFOCO, E., CHEN, W., R. PAUL, D. A., COOPER, N. R. $\beta 1$ integrin antagonism on adherent, differentiated human neuroblastoma cells triggers an apoptotic signaling pathway. **Neuroscience** , 101, pp. 1145-1152, 2000.

BORGES-OSÓRIO, M. R., ROBINSON, W. M. **Genética Humana**.Editora Artmed. 2^a ed. Porto Alegre: 200, pp. 278-299

BRANS, B., BODEI, L., GIAMMARILE, F., LINDEN, O., LUSTER, M., OYEN,. Clinical radionclide therapy dosimetry: the quest for the Holy Gray. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging**, 34, pp. 722-786, 2007.

BRAUD, S., BON, C., WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie.**, 82, pp. 851-859, 2000.

CACCAMO, E. A., SCALTRIT, M., CAPORALI, A. C., D'ARCA, D., SCORCIONI, F., ASTANCOLLE, S. Cell detachment and apoptosis induction of immortalized human prostate

epithelial cells are associated with early accumulation of a 45 kDa nuclear isoform of clusterin. **Biochem. J.**, 382, pp. 157–168, 2004.

CALVETE, J., MORENO-MURCIANO, M. P., THEAKSTON, R. D. G., KISIEL, D. G., MARCINKIEWICZ, C. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. **Biochem. J.**, 372, pp. 725–734, 2003.

CALVETE, J., JURGENS, M., MARCINKIEWICZ, C., ROMEROS, A., SCHRADER, M., & NIEWIAROWOSKI, S.. Disulphide-bond pattern and molecular modeling of the dimeric disintegrin EMF-10, a potent and selective integrin $\alpha 5\beta 1$ antagonist from *Eristocophis macmahoni* venom. **Biochim. J.**, 354, pp. 573-581, 2000.

CALVETE, J., WANG, Y., MANN, K., SCHAFER, W., NIEWIAROWSKI, S., STEWART, G. The disulphide bridge pattern of snake venom disintegrin, flavoridin and echistatin. **FEBS Lett**, 3009, pp. 316-320, 1992.

CARDOSO, J. L. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvie, 2003.

CARPENTIER, J., GORDEN, J., GOLDSTEIN, R., ANDERSON, M., BROWN, L. . Binding and internalization of ¹²⁵I-LDL in normal and mutant human fibroblasts : a quantitative autoradiographic study. **Exp. Cell Res** , pp. 135-142, 1979.

CHATTERJEE, S., MATSUMURA, A., SCHRADERMEIER, J., GILLESPIE, G. Y. Human malignant glioma therapy using anti- $\alpha 5\beta 3$ integrin agents. **Journal of Neuro-Oncology**, 46, pp. 135–144, 2000.

CHEN, X., PARK, R., K. V., GONZALES-GOMEZ, I., TOHME, M., MOATS, R. Longitudinal micro PET imaging of brain tumor growth with F-18-labeled RGD peptide. **Mol. Imaging Biomol**, 8, pp. 9-15, 2006

CORREA, M., DURVANEI, A., MOURA-DA-SILVA, A., K.F.PIZZOCARO, RUIZ, I. Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin. **Toxicon**, 40, pp. 739-748, 2002.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. **In: Patologia Estrutural e Funcional.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000.

CROWELL, J. The chemopreventive agent development research program in the Division of Cancer Prevention of the US National Cancer Institute. **Eur. J. Cancer**, 2005.

CURLEY, G. P., BLUMB, H., HUMPHRIES, M. Integrin antagonists. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci.**, 56, pp. 427-441, 1999.

CURTIN, J. F., DONOVAN, M., COTTER, T. G Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **J. Immunol. Methods.**, 265, pp. 49-72, 2002.

DAGLI, M. Disseminação linfática to tumor de Ehrlich: estudo experimental. **Tese de Doutorado.** Universidade de São Paulo, 148. São Paulo, 1989.

DANEN, E., MARCINKIEWICZ, C., CORNELISSEN, I., VAN KRAATS, A., PACHTER, J., RUITER, D. A disintegrin eristostatin interferes with integrin $\alpha 4\beta 1$ function with experimental metastasis of melanoma cells. **Exp.Cell. Res.**, 238, pp. 188-196, 1998.

DENNIS, M., HENSE, L.,PITTI, R. Platelet glycoprotein lib-IIIa protein antagonist from snake venom: evidence for a family of platelet-aggregation inihibitor. **Proc. Natl.Acad.Sci.USA**, 187, pp. 2471-2475, 1990.

DÍAZ, C., VALVERDE, L., BRENES, O., RUCAVADO, A., GUTIÉRREZ, J. M. Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on human endothelial cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, 94, pp. 520–528, 2005.

DWAYNE G. STUPACK, DAVID A. CHERESH. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell Survival. **Journal of Cell Science**, 115, pp. 3729-3738, 2002.

ERB, E.-M., TANGEMANN, K., BOHRMANN, B., MULLER, B. ENGEL, J. Integrin $\alpha IIb\beta 3$ reconstituted into lipid bilayers is nonclustered in its activated state but clusters after fibrinogen binding. **Biochemistry**, 36, pp. 7395-7402,1997.

EXTERMANN, M., CHEN, H., CANTOR, A., CONCORAN, M., MEYER, J. E., CAVANAUGHT, D. Predictors of tolerance to chemotherapy in older cancer patients:a prospective pilot study. **Eur. J. Cancer**, 38, pp. 1466-1473, 2002.

Fapesp - Venenos de serpernte. Acesso em 22 de Novembro de 2009. Disponível em Fapesp, 2009: <http://www.bv.fapesp.br/namidia/noticia/4472/venenos/>).

FARIA, M. H., PATROCIONIO, R. M. Immunoexpression of tumor suppressor genes p53, p21waf1/cip1and p27kip1 in human astrocytic tumors. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, 65, pp. 1114-1122, 2007.

FARIA, R. E., SOUZA, A. R., AARESTUP, F. M. Assesment of apoptosis in breast cancer: association with histological grade and prognostic factors. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 51, pp. 209-218, 2005.

FARISS, W. M., CHAN, B. C., MANISHA, P., VAN, B., STEN, O. Role of mitocontria in toxic oxidative stress. **Molecular Intervention**, pp. 94-111, 2005.

FERREIRA, S. H. Um Fator Potenciador da Bradicinina no Veneno de Bothrops jararaca. **Br. J. Pharmacol Chemothe**, 24, 163-169, 1965.

FLYNN, A. N., BURET, A. G. Proteinase-activated receptor 1 (PAR-1) and cell apoptosis. **Apoptosis**, 9, pp. 729–737, 2004.

FREITAS, T., FREZARD, F. Encapsulation of native crotoxin in liposomes: a safe approach for production of antivenom and vaccination against *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon** , 35, pp. 91-100, 1997.

FRISCH, S. M., SCREATON, R. A. Anoikis mechanisms. **Current Opinion in Cell Biology** 13, pp. 555–562, 2001.

- GABRIEL, J. A. Understanding Cancer. **In: The Biology of Cancer**. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd., 2007. Cap.1
- GIBALDI, M.; PERRIER, D. One compartmental model. **In: Pharmacokinetics**. New York: informa Healthcare., 2007. Cap. 1
- GIOACOTTI, F. G. Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. **Current Opinion in Cell Biology**, 9, pp. 691-700, 1997.
- GOULD, R., POLOKOFF, M., FRIEDMAN, P., HUANG, T., HOLT, J., COOK, J. Disintegrin: a family of integrin inhibitory protein from viper venoms. **Proc.Soc.Exp. Biol. Med** , pp. 168-171, 1990.
- GREENE, H. 1. Snakes: The Evolution of Mystery in Nature. **University of California Press**, 351p. 1997.
- GREENWALD, B. D., HARPA, N., YIN, J., HUANG, Y., TONG, Y., BROWN, V. L. Loss of Heterozygosity Affecting the p53, Rb, and mcc/apc Tumor Suppressor Gene Loci in Dysplastic and Cancerous Ulcerative Colitis1. **Cancer Research**, 53, pp. 741-745, 1992.
- GRIVICICH, I., REGNER, A., ROCHA, A. B. Morte Celular por apoptose. Revista Bras. **Cancerologia**, 53, pp. 235- 353, 2007.
- HAUBNER, R. $\alpha_5\beta_3$ integrin imaging: a new approach to characterize angiogenesis? **Eur. J. Nucl. Med. Mol imaging**, 33, pp. 54-63, 2006.
- HAUBNER, R., FINSINGER, D. KESSLER, H. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the $\alpha_v\beta_3$ integrin for a new cancer therapy. **Angew. Chem. Int. Ed. Eng.**, 36, pp. 1374-1389, 1997.
- HO, K, YAZAN, L.S., ISMAIL, N., ISMAI, M. A novel alpha(v)beta (3)-blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. **Clinical and Experimental Metastasis**, 25, pp. 53-64, 2008.
- HO, K., YAZAN, L. S., ISMAIL, N., ISMAIL, M. Apoptosis and cell cycle arrest of human colorectal cancer cell line HT-29 induced by vanillin. **Cancer Epidemiology**, 33, pp. 155-160, 2009.
- HOCHEGGER, H., & SHUMICHI TAKEDA, T. H.. Cyclin-dependent kinases and cell cycle transition: does one fit all? **Nature**, 8, 910-916, 2008.
- HONG, T., HUANG, J., LUCCHESI, B. Effect of thrombolysis on myocardial injury: recombinant tissue plasminogen activation vs. alfineprase. **Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.**, 290, pp. 959-967, 2006.
- HONGA, S. Y., LEEB, H., YOUB, W. K., CHUNGA, K. H., KIMB, D. S., SONG, K. The snake venom disintegrin salmosin induces apoptosis by disassembly of focal adhesion in bovine capillary endothelial cells. **Biochim. Biophys. Commun.**, 302, pp. 502-508, 2003.
- Hospital do Câncer: **Cancer**. Acesso em 18 de Novembro de 2009. Disponível em Hospital do Câncer, : <http://www.hcanc.org.br/index.php?page=402>

- HUANG, T. What have snakes taught us about integrins? **Cell Mol. Life Sc**, 54, pp. 527-540, 1998.
- HUSTINX, R.; ALAVIA. **Tumor imaging**: Editora Jonh Wiley and Sons Ltd, Englan , 2005.
- HYNES, R. Versatility, modulation and signaling in cell adhesion. **Cell**, 69, pp. 11-25, 1992.
- INCA, 2010. Estimativas 2010: Incidências de câncer no Brasil. Acesso em 12 de janeiro de 2010. Disponível em Instituto Nacional do Câncer: <http://www.inca.gov.br>.
- Instituto de Tratamento do Cancer. Acesso em 18 de Novembro de 2009. Disponível em Instituto de Tratamento do Cancer: <http://www.itcancer.com.br/site/index.php/tratamento>.
- IRSA- International Radiosurgery Association Acesso em 18 de Novembro de 2009. Disponível em IRSA—<http://www.irsa.org/glioblastoma.html>.
- JAHAN, I., FUJIMOTO, J., ALAM, S. M., SATO, E., SAKAGUCHI, H., TAMAYA, T. Role of protease activated receptor-2 in tumor advancement of ovarian cancers. **Annals of Oncology**, 18, pp. 1506–1512, 2007.
- JAN, L. B. **Semin Pediatr Infect Dis**, 15 , 58-64, 2004.
- JIA, L., SHIMOKAWA, K., BJARNASSON, J., FOX, J. Snake venom metaloproteinas: structure, function and relationship to the ADAMS family of proteins. **Toxicon**, 34, pp. 1269-1276, 1996.
- JIA, L., WANG, X., SHANNON, J., BJARNASSON, J., FOX, J. Function of disintegrin-like/cystein-rich domain of atrolysin A. *J.Biol. Chem* , 292, pp. 13094-13102,1997.
- JONES, J.; WALKER, R. Integrins: a role as cell signalling molecules. **J Clin Mol Pathol**, 52, pp. 208–213, 1999.
- JONHONSON, D., C.L, W. Cyclins and Cell cycle Checkpoints. *Ann.Ver.Pharmacol.Toxicol* , 39, pp. 295-312, 1999.
- KAIN, M. Alterations in the tumor suppressor genes p53, RB, p16/MTS1, and p15/MTS2 in human pancreatic cancer and hepatoma cell lines. **Journal of Gastroenterolog** , 32, pp. 40-46,1997.
- KANG, I., LEE, Y.; KIM, D. A novel disintegrin salmosin inhibits tumor angiogenesis. **Cancer Res**, 59, pp. 3754-3760, 1999.
- KIM, D. S., JANG, Y.-J., JEON, O.-H., & KIM, D.-S. Saxatilin, a Snake Venom Disintegrin, Suppresses TNF- α -induced Ovarian Cancer Cell Invasion. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, 40, pp. 290-294, 2007.
- KINI, R.; EVANS, H Structural domain in venom proteins: evidence that metaloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrin) from snake venom are derived by proteolysis from common precursor. **Toxicon**, 30, pp. 265-293, 1992.

KLENER JR., P.; ANDERA, L.; KLENER, P.; NECAS, E.; ZIVNÝ, J. Cell death signalling pathways in the pathogenesis and therapy of haematologic malignancies: Overview of Apoptotic Pathways. **Folia Biologica**, 52, pp.34-44, 2006.

KUBOTA, Y., KUBOTA, K., TANI, S. DNA binding properties of Dapi (4', 6-diamino-2-phenylindole) analogs having an imidazoline ring or a tetrahydropyridindole ring: Groove-binding and intercalation. **Nucleic Acids Symposium**, 44, pp. 53-54, 2000.

KUMAR, C. C., HUIMING-NIE, ROGERS, C. P., MALKOWSKI, M., MAXWELL, E. Biochemical characterization of the binding of echistatin to integrin $\alpha_v\beta_3$ receptor. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutic**, 283, pp. 843-853, 1997.

LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature**, 227, pp. 680-685, 1970.

LAKSHMI, K., AHOUE, M., FRANCINE, F., ATHAN, K Signaling from Protease-activated Receptor-1 Inhibits Migration and Invasion of Breast Cancer Cells. **Cancer Research**, 61, pp. 5933-5940, 2001.

LAMMERS, T., PESCHKE, P., KUHNLEIN, R., SUBR, V., ULBRICH, K., HUBER, P.. Effect of intratumoral injection on the Biodistribution and the therapeutic potential of HPMA copolymer-Based drug delivery systems. **Neoplasia**, 8, pp. 788-795, 2006.

LEWIS, R.G., GARCIA, M.L. Therapeutic potential of venom peptides **Nature**, 2, 790-802, 2003.

LIGON BL. Penicillin: its discovery and early development. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, 15, pp 52-57, 2004.

LIOTTA, L. A., STEEG, P. S., STELLER-STEVENSON, W. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. **Cell**, 64, pp. 327-336, 1991.

LODISH, H. BERK, A., KAISER, C. A., KRIEGER, M., SCOTT, M.P., BRETSCHER, A., PLOEGH, H., MATSUDAIRA, P. Regulating the Eukaryotic Cell Cycle. In: **Molecular cell biology**. United States of America: W.H. Freeman & Co. 2008. Cap.20.

LOMEÑA, F.; SOLER, M. Clinical Application of Pet. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 48, 2005.

LOPES, A., OLIVEIRA, A. M.; PRADO, C. B. Principais genes que participam da formação de tumores. **Revista De Biologia E Ciências Da Terra**, 2. 2002.

LOWRY, O.H.; ROSENBOUGH, N.I.; FAAR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193, pp.265-275, 1951.

MACDONALD, F., FORD, C.; CASSON. General principles. In: **Molecular Biology of Cancer**. London: **BIOS Scientific Publishers** 2004. Cap.1.3.,

MACLANE, M., VIJAY-KUMAR, S., MARCINKIEWICZ, C., CALVETE, J., NIEWIAROWSKI, S. Importance of structure of RGD-containing loop in disintegrin echistatin and eristotatin for recognition of $\alpha_{IIb}\beta_3$ $\alpha_5\beta_3$ integrin. **FEBS. Let**, 39, pp. 139-143, 1996.

MCLANE, M., MARCINKIEWICZ, C., VIJAY-KUMAR, S., WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I., NIEWIAROWSKI, S. Viper venom disintegrin and related molecules. **Soc. Exp. Biol. Med.**, pp. 109- 119, 1998.

MARKLAND, F. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, 36, pp. 149-180, 1998.

MATSUI, T., FUJIMURA, Y., TITANI. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim.Biophys.Act** , 1477, pp. 146-156, 2000.

MCCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology Letters**, 99, pp. 157-168, 1998.

MIZEJEWSKI, G. J.. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. Society for Experimental Biology and Medicine , 222, pp. 124-136, 1999.

MOLINARI, M. Cell cycle checkpoint and their inactivation in human cancer. **Cell Proliferation**, 33, 261-274, 2005.

MOLL, S., KENYON, P., BERTOLI, L., DE MAIO, J., HOMESLEY, H., DEITCHER, S. Alfimeprase, Phase II Trial of a novel-acting fibrin degradation agent, for occluded central venous access devices. **J. Clin.Oncology**, 24, pp. 3056-3060, 2006.

MONTESANO, R., HALL, J. Environmental causes of human cancer. **Eur. J. Cancer**, 37, pp. 67-68, 2001.

MOSMANN, T. I. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth**, 65, pp. 55-64. 1983

MOURA-DA-SILVA, A., MARCINKIEWICZ, C., MARCINKIEWICZ, M; NIEWIAROWSKI, S. Selective recognition of $\alpha 2\beta 1$ integrin by jararhagin, a metalloproteinase/disintegrin from Bothrops jararaca venom. **Thromb. Res.**, 102, pp. 153-159, 2001.

NIEWIAROWSKI, S., McLANE, M. K., STEWART, G. **Sem. Hematol.** 131, pp. 289-300,1994.

NOBLE, R. *Biochem Cell Biol* , 12, 68, 1990.

OLIVA, I. B., COELHO, R. M., BARCELLOS, G. G., SALDANHA-GAMA, R., WERMELINGER, L. S., MARCINKIEWICZ, C. Effect of RGD-disintegrins on melanoma cell growth and metastasis: involvement of the actin cytoskeleton, FAK and c-Fos. **Toxicon**, 50, pp. 1053-1063, 2007.

OLIVEIRA R.; SANTOS D.; FERREIRA D.; COELHO P.; VEIGA F. (2006). Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** 2, p.151-165.

PALMA, M. S., YAMANE, T., & CAMARGO, A. C. Biodiversidade: Valor econômico e valor social. Acesso em 12 de janeiro de 2010. Disponível em Biodiversidade: Valor econômico e valor social: <http://www.comciencia.br/reportagens/biodiversidade>.

PARNELL, P., WOLL, P. Principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery. Surgery Oxford**, 24, pp. 272-276, 2003.

PAUWELS, E. K., MCCREADY, V. R., STOOT, J. H., DEURZEN, D. F. The mechanism of accumulation of tumor-localising radiopharmaceuticals. *J. Med. Nucl* , 25, pp. 277-305, 1988.

PERDIGÃO, J., TAVARES, Á. Ciclo celular e nova terapias contra o cancro (o ano do nobel). **Boletim de Biotecnologia**, pp.7-14.

PETRUZZELLI, L; TAKAMI, M; HUMES, H.D; Structure and function of cell adhesion molecules. **Am.J.Med.**, 106, pp, 578-584, 1998.

POLLOCK, R., MORTON, D. Principles of surgical oncology. **Cancer Medicine**, pp. 569-583, 2003.

PU, Q. Q., & STREULI, H. C. Integrin control of cell cycle: a new role for ubiquitin ligase. **Bio Essays**, 24, pp. 17-21, 2002.

PUJATTI, P. B., SOARES, M. A., CASTRO, M. S., SIMAL, C., SANTOS, R. G. characterization, and biodistribution study of technetium-99m labeled Crotalus venom. In: International. International Symposium in trends on radiopharmaceuticals. Book of extend synopses , 149 – 150 (2005b), 2005.

RANG, H. P., & DALE, M. M. Farmacologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001.

RIBBLE, D., GOLDSTEIN, N., NORRIS, D. A., G.SHELAMN, Y. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **BMC Biotechnology**, 12, pp. 1-7, 2005.

ROBILOTTA, C. C. A tomografia por emissão de pósitrons: uma nova modalidade na medicina nuclear brasileira. **Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health**, 20, 133-142, 2006.

ROBILOTTA, C. C. Emission Tomography: SPECT and PET. **Computación y Sistemas**, 7, pp. 167 - 174, 2004.

ROCHA E SILVA, M. The physiological significance of bradykinin. **Ann. N.Y. Acad. Sci**, 104, pp. 190-210, 1963.

SANCHEZ, E. F., SWENSON, S. Proteases from South American snake venoms affecting fibrinolysis. **Curr. Pharmaceuti. Analy**, 3, pp. 147-157, 2007.

SANCHEZ, E., GABRIEL, L., GONTIJO, S., GREMSKI, L., VEIGA, S., EVANGELISTA, K. Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus* venom. **Arch. Biochem. Biophys**, 468, pp. 193-204, 2007.

SCHULZ, W. A. Molecular Biology of Human Cancer. Netherlands: Springer.

SHCWARTZ, M., ASSOIAN, R. Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmatic signaling pathways.. **Journal of cell scienc.**, 14, pp. 2553-2560, 2007.

SHEN, S., KHAZAELI, M., GILLESPIE, G., ALVAREZ, V. Radiation dosimetry of ¹³¹I-chlorotoxin for targeted radiotherapy in glioma-bearing mice. **J. Neur.Oncol.**, 71, pp. 113-119, 2005.

SHEU, J., LIN, C., HUANG, T. Triflavin, an antiplatelet peptide, inhibits tumor cell-extracelular matrix adhesion through an arginine-glycine-aspartic acid-dependent. **J.Lab.Clin.Med.**, 123, pp. 256-263, 1994.

SHI, X., GANGADHARAN, B., BRASS, L. F., RUF, W., & MUELLER, B. M. Protease-Activated Receptors (PAR1 and PAR2) Contribute to Tumor Cell Motility and Metastasis. **Mol Cancer Res.**, 7, pp. 395-402, 2004.

SHIMOKAWA, K. Sequence and biological activity of catrocollastatin-C: a disintegrin-like/cystein-rich-two-domain from *Crotalu atrox* venom. **Arch Biochem biophys**, 343, pp. 35-43, 1997.

SILVA, T. H., BUTERRA, A. P., LEAL, D. H., ALVES, R. J. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese - Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha_v\beta_3$. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 43, pp. 1-17, 2007.

SOLÁ, S., PEDRO, T., FERREIRA, H., & RODRIGUES, C. M.. Apoptose: uma questão de vida ou morte. (s/a)

SOARES, M.A. Identificação e caracterização do efeito antitumoral da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* e avaliação do seu potencial uso na detecção de tumores. 2007. 157 folhas. Ciência e Tecnologia das Radiações, Técnicas Nucleares aplicadas na Saúde e na Biologia – Centro e Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear.

SOPRANI, J. “Identificação do efeito antitumoral de um polipeptídeo isolado da peçonha do peixe-escorpião *scorpaena plumieri* e avaliação do seu potencial uso no diagnóstico de tumores”. 2008. 157 folhas. Ciência e Tecnologia das Radiações, Técnicas Nucleares aplicadas na Saúde e na Biologia – Centro e Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear.

STOKER, W., GRAMS, F., BAUMANN, U., REINEMER, P., GOMIS-RUTH, F. M., BODE, W. The metzincins-topological and sequential relation between the astacins, adamalysin, and matrixins (colagenase) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Sci.**, 4, pp. 823-840, 1995.

TANJONI, I., WEINLICH, R., DELLA-CASA, M. S., CLISSA, P. B., SALDANHA-GAMA, R. F., FREITAS M. S., BARJA-FIDALGO, C., AMARANTE-MENDES, G. P., MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. **Apoptosis**, 10, pp. 851–861, 2005.

Texas A&M University, 2009. Acesso em 17 de dezembro de 2009. Disponível em: Texas A&M University, 2009: <http://www.cvm.tamu.edu/oncology/faq/questions/cancer>

THRALL H., ZIESSMAN A., JANIS P. O. Clinical Nuclear Medicine. **In: Nuclear Medicine**. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2006. Cap.4.

TINOIS E. Imagens Funcionais PET e fMRI. **Multiciência: tecnologia para a saúde**. p.1-14, 2005.

TOMITA, G. Enhancement of fluorescence emission of acridine orange by nucleosides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 27, pp. 614-615, 2005.

TRIKHA, M., de CLERCK, Y., MARKLAND, F. Contortrostatin, a snake venom DISINTEGRIN, inhibits β_1 integrin-mediated human metastatic melanoma cell adhesion and blocks experimental metastasis. **Cancer Res.**, 54, pp. 4993-4998, 1994.

TU, A. **Venons: chemistry and molecular biology**. Editora John Wiley & Sons. New York.: 1977.

TUCKER, G. C. inhibitors od integrins. **Curr. Opin. Pharmacol.**, 2, pp. 724-730, 1996.

USAMI, Y. F., MIURA, S., SHIMA, H., YOSHIDA, E., YOSHIDA, A., HIRARO, K., 28kDa-protein with disintegrin-like structure (jararagin C) purified from Bothrops jararaca inhibits collagen and ADP induced platelet aggragation. **Biochem. Res. Commum.**, 201, pp. 331-339, 1994.

VALENTIJN, A.J., ZOUQ, N., GILMORE, A.P. Anoikis. **Biochemical Society Transactions**, 32, pp. 421-425, 2004.

VAN WAES, C. Cell adhesion and regulatory molecules involves in tumor formation, hemostasis and wound healing. **Head Neck**, 17, pp. 140-147, 1995.

VENERI, A. Imaging treatment effects in Alzheimer's disease. **Magnetic Resonance Imaging**, 25, pp. 953-968, 2007.

VERGNOLLE, N. Clinical Relevance of proteinase activated receptores (PARS) in the gut. **BMJ Group**, 54, pp. 867-874, 2005.

WANG, W., SHIH, C., HUANG, T. A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkilysim, from Agkistrodon acutus venom. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 324, pp. 224-230, 2004).

WERMELING, D. Ziconotide, an Intrathecally Administered N-Type Calcium Channel Antagonist for the Treatment of Chronic Pain **Pharmacotherapy**, 8, 1084-1094, 2005.

WINBERG, K., MUNE, E., TOLMACHEV, V., SJOBERG.S. Radiobromination of closo-carborates using palladium-catalysed halogen exchange. **J. Labelled. Compd. Radiopham**, 48, pp. 195-202, 2005.

WORKMAN, P., KAYE, S. Cancer therapeutics: a Trends Guide with eleven reviews of various new potentials approaches to the development of anticancer drugs. **Trends. Mol. Med.Suppl.**, 8, pp. 1-73, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION . (2006). Acesso em 19 de Novembro de 2009, disponível em World Health Organization. Cancer. Fact sheet: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>

XIONG, J., T., S., ZHANG, R., JOACHIMIAK, A., FREH, M., GOODMAN, S. Cristal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha 5\beta 3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science*, 296, pp. 1151-155, 2002.

XUE, C.-B. R., JACKSON, S., RAFALSKI, M., ROCKWELL, A., MOUSA, S., OLSON, R. E. Design, synthesis and in vitro activities of benzamide-core Glycoprotein IIb/IIIa antagonists: 2,3 diaminopropionic acid derivatives as surrogates of aspartic acid. **Bioorg. Med. Chem. Bioorg. Med. Chem**, 5, pp. 693-705, 1997.

YANG, R., TANG, C., CHUANG, W., HUANG, T., HCPENG, HUANG, T. Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin. **Toxicon**, 45, pp. 661-669. 2005.

YDE, C. W., ISSINGER, O. Enhancing cisplatin sensitivity in MCF-7 human breast cancer cells by down-regulation of Bcl-2 and cyclin D. **International Journal of Oncolog**, 29, pp. 397-1404, 2006.

YIN, Y.-J., ZAIDOUN SALAH, S. G.-G., COHEN, I., COHEN, S., EVEN-RAM, MAOZ, M. Human Protease-Activated Receptor 1 Expression in Malignant Epithelia: A Role in Invasiveness. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, 23, pp. 940-944, 2003.

ZALUTSKY, M. R., & NARULA, A. S. A method for the radiohalogenation of proteins resulting in decreased thyroid uptake of radioiodine. *Appl. Radiat. Isot*, 38, pp. 1051-1055. 1987.

ZHOU, Q., SHERWIN, R. PARRISH, C., RICHTERS, V., GROSHEN, S., TSAO-WEI, D., Contortrostatin, a dimeric disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix*, inhibits breast cancer progression. **Breast Cancer Res. Treat**, 61, pp. 249-260, 2000.

APÊNDICE A - ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DO DNA ATRAVÉS DA COLORAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA/BROMETO DE ETÍDIO

O laranja de acridina (LA) é um corante fluorescente catiônico seletivo de ácidos nucleicos utilizado para a determinação do ciclo celular. Trata-se de um corante permeável à membrana celular que interage com o DNA e RNA por intercalação ou atrações eletrostáticas, respectivamente. Quando ligado ao DNA, que é muito semelhante ao espectro da fluoresceína, possui uma excitação máxima de 502 nm e emissão máxima a 525 nm (verde). Quando se associa com o RNA, a excitação máxima é 460 nm (azul) e a emissão máxima é de 650 nm (vermelho) (TOMITA, 2005).

Vistas por microscopia de fluorescência as células viáveis aparecem com um núcleo verde brilhante com estrutura intacta enquanto que as células apoptóticas exibem um núcleo verde brilhante mostrando densa condensação da cromatina com áreas verdes (HO et al, 2009). Laranja de acridina também entra em compartimentos ácidos tais como lisossomos e torna-se protonado. Nestas condições de baixo pH, o corante vai emitir luz laranja. LA também pode ser usado em conjunto com brometo de etídio (BE) para diferenciar células vivas e apoptóticas, neste caso a fluorescência de LA é mascarada pela coloração do brometo de etídio.

O brometo de etídio também é um corante intercalante específico de ácidos nucleicos que emite uma fluorescência laranja. No entanto BE só é captado pelas células quando a integridade da membrana citoplasmática é perdida. Quando tratadas com LA/BE, as células viáveis apresentam núcleo normal verde, nas células em processo inicial de apoptose o núcleo fica verde e brilhante com cromatina condensada ou fragmentada, em células apoptóticas tardias o núcleo aparece com coloração laranja e com cromatina condensada e fragmentada. Células que morreram por necrose apresentam núcleo laranja estruturalmente normal (RIBBLE et al, 2005).

APÊNDICE B - FARMACOCINÉTICA

A farmacocinética é definida como o estudo quantitativo do desenvolvimento temporal dos processos de absorção, distribuição, biotransformação e excreção dos fármacos. Nestes estudos, os teores dos fármacos e seus metabólitos (produtos da biotransformação) no organismo são determinados, permitindo a obtenção de importantes dados sobre estas substâncias (BARCELLOS, 2009).

A caracterização do perfil farmacocinético de uma nova molécula pode ser obtida do cálculo de parâmetros matemáticos calculados a partir de dados de biodistribuição. Os principais parâmetros são a área sob a curva (ASC), o volume de distribuição (Vd), a depuração (ou clearance), a meia-vida ($t_{1/2}$) e a biodisponibilidade.

Para simplificação dos cálculos realizados neste trabalho foi assumido que o perfil farmacocinético correspondia ao modelo monocompartimental, no qual o corpo é considerado um compartimento único. Este modelo descreve adequadamente as alterações sofridas ao longo do tempo na concentração plasmática e na via de excreção de fármacos que após a administração se distribuem rapidamente para os tecidos.

A ASC representa a quantidade total de fármaco absorvido. É considerado o mais importante parâmetro na avaliação da biodisponibilidade, sendo expresso em quantidade/volume x tempo (mg/mL x h) e pode ser considerado representativo da quantidade total de fármaco absorvido após administração de uma só dose desta substância ativa (BARCELLOS, 2009). A ASC foi calculada a partir do gráfico de cinética sanguínea das moléculas e foi utilizada para determinação dos tempos de meia-vida, volume de distribuição e depuração.

A biodisponibilidade é uma característica do medicamento administrado a um sistema biológico intacto e indica, simultaneamente, de acordo com qual cinética e proporção um fármaco alcança a circulação geral a partir da dose contida no medicamento administrado. O cálculo deste parâmetro é dispensável quando a via de administração é a endovenosa, pois 100% da droga estão disponíveis na circulação (BARCELLOS, 2009).

Volume de distribuição (Vd) é um termo usado para quantificar a distribuição de uma droga pelo corpo após administração oral ou parenteral. É definido como o volume no qual uma determinada quantidade de droga precisaria ser uniformemente distribuída para produzir a concentração sanguínea observada (BARCELLOS, 2009). Assumindo que o corpo consiste de um único compartimento e conhecendo-se a dose administrada por via endovenosa e sua concentração dosada no sangue, o volume do compartimento (volume aparente de distribuição) pode ser determinado a partir da seguinte equação (GIBALDI & PERRIER, 2007):

$$Vd = \text{Dose}/\text{ASC} \quad (1)$$

Onde:

Vd = volume de distribuição aparente

ASC = Área sob a Curva

Clearance é um termo inglês usado universalmente para indicar a remoção completa de determinada substância de um volume específico de sangue na unidade de tempo. Depuração é o termo em português que mais se aproxima do sentido do termo inglês (BARCELLOS, 2009). A depuração plasmática pode ser calculada a partir da equação abaixo (GIBALDI & PERRIER, 2007).

$$Cl = K \times Vd \quad (2)$$

Onde:

Vd = volume de distribuição aparente

K = constante

A meia-vida é um conceito cronológico e indica o tempo em que uma grandeza considerada reduz à metade de seu valor. Em farmacocinética ela representa o tempo gasto para que a concentração plasmática ou a quantidade original de um fármaco no organismo se reduza à metade. A cada intervalo de tempo correspondente a uma meia-vida, a concentração decresce em 50% do valor que tinha no início do período. Esse conceito é operacionalizado pela observação da concentração no plasma. Para a maioria dos fármacos, a meia vida é

constante em uma larga faixa de concentrações (BARCELLOS, 2009). A meia vida pode ser calculada de acordo com a equação abaixo (GIB. ALDI & PERRIER, 2007):

$$t_{1/2} = \ln_2 / K \quad (3)$$

Onde:

$$\ln_2 = 0,693$$

K = Constante

ANEXO - 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 152/2007**, relativo ao projeto intitulado "*Identificação e caracterização de novos fármacos, derivados de peçonhas animais, para a terapia e diagnóstico de tumores*", que tem como responsável **Raquel Gouvêa dos Santos**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo *Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)*, tendo sido aprovado na reunião de **5/ 12/2007**.

Este certificado expira-se em **5/ 12 / 2012**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 152/2007**, related to the project entitled "*Identification and characterisation of new antitumoral drugs derived from animal venoms for tumours therapy and diagnosis*", under the supervision of **Raquel Gouvêa dos Santos**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the *Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)*, and was approved in **December 5, 2007**.

This certificate expires in **December 5, 2012**.

Belo Horizonte, 11 de Dezembro de 2007.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha
Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 - Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod. Cert. v1.0)

ANEXO – 2

Comitê de Ética em Pesquisa

Belo Horizonte, 13 de outubro de 2008.

Expediente: Memorando n. 015/2008/CEP

De: Marluce A. Assunção Oliviera
Coordenadora do CEP/Funed

Para: Dr. Eladio Oswaldo Flores Sanchez

Referência: Projeto de pesquisa “Caracterização de estrutura-função de proteínas de venenos de serpente ativos no sistema hemostático. Potencial tecnológico de agentes fibrinolíticos”.

Assunto: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Funed (CEP)

O projeto de pesquisa “**Caracterização de estrutura-função de proteínas de venenos de serpente ativos no sistema hemostático. Potencial tecnológico de agentes fibrinolíticos**”. foi apreciado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Funed (CEP) e:

- considerando que, pelas informações contidas no projeto, não foi detectado riscos à integridade da saúde, e não foi encontrado nenhum ponto que fere a Resolução 196/96 do CNS;
- considerando que o Responsável pelo Projeto apresenta qualificação e experiência para condução do estudo, o mesmo está **APROVADO** quanto aos aspectos éticos;

Atenciosamente,


Marluce A. Assunção Oliviera.
Coordenadora do CEP/FUNED.

ANEXO 3 - RESUMO

XXIII REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE
BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 2008HEMORRHAGIC METALLOPROTEINASE, LEUCUROLYSIN-B FROM
BOTHROPS LEUCURUS VENOM

Gabriel, L.M.¹., Gremski, L.H.²., Veiga, S.S.²., Evangelista, K.S.³., Eble, J.A.³.,
Richardson, M.¹., Sanchez, E.F.¹

¹Research and Development Center, Ezequiel Dias Foundation, 30510-010, Belo Horizonte, MG, ²Dept. of Cell Biology, Federal University of Parana, ³Institute of Physiological Chemistry, University of Muenster, Germany.

Objective. This work focuses on the structural, biological and immunochemical properties of leucurolysin-B (leuc-B), an hemorrhagic metalloproteinase isolated from the medically important *Bothrops leucurus* venom. **Methods and Results.** The proteinase, on SDS-PAGE under reducing conditions migrated as a single-chain protein with an apparent Mr of 55 kDa corresponding to the size of typical P-III metalloproteinases from snake venoms (SVMPs). The partial amino acid sequence of leuc-B was determined by automated Edman sequencing of peptides derived from digests of the S-reduced and alkylated protein with trypsin. Leuc-B is a zinc-containing endopeptidase characterized by the presence of a protease domain, a disintegrin-like (ECD sequence instead of the typical RGD motif) and a cysteine-rich C-terminal domain. The metal ion chelators, e.g. EDTA, significantly inhibited the enzymatic activity. In addition, its proteolytic activity was stimulated by the divalent cations Ca²⁺ and Mg²⁺ but inhibited by Zn²⁺ and Cu²⁺. Proteolytic specificity of leuc-B is highly specific and cleaves the X-Leu bond. The catalytic activity on extracellular matrix proteins could readily lead to loss of capillary integrity resulting in hemorrhage occurring at those sites, with alterations in hemostatic system. Antibodies against leuc-B were generated and tested in western blot and ELISA against related proteinases. Anti-leuc-B antibodies showed cross-reactivity between leuc-B and other SVMPs. **Conclusion.** Leuc-B belongs to the reprotolysins, a subfamily of metalloproteinases metzincins. The structure-function correlation and aspects of the immunochemical properties of leuc-B are presented.

Support: FAPEMIG, CNPq, CNEN, CDTN

ANEXO 4 - RESUMO

**XVI WORLD CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY ON
TOXICONOGY
X CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE
TOXICONOLOGIA, 2009**

**EFFECT OF LEUCUROLYSIN-B ISOLATED FROM *BOTHROPS LEUCURUS* ON
BREAST TUMORS CELLS**

Gabriel, L.M.¹, Sanchez, E.O.F.², Silva, S.G.², Santos, R.S.¹

¹Laboratory of Radiobiology - Development Center of Nuclear Technology (CDTN / CNEN), BH, MG, Brazil, ²Laboratory of Biochemistry and chemistry of proteins II - Research and Development Center, Ezequiel Dias Foundation, BH, MG, Brazil; E-mail: lucilenegabriel@hotmail.com

Leucurolysin-B (Leuc-B) is a metalloproteinase class P-III isolated from *Bothrops leucurus* (BLV) and represents approximately 1.2% of total proteins in the venom. Leuc-B possess a disintegrin-like domain (ECD) and contains the characteristic motif **HEXXHXXGXXH** of metalloproteinases. Disintegrins are cysteine-rich proteins capable to interact with integrins from membranes of normal and tumor cells triggering a variety of pharmacological activities. Several disintegrins from snake venom have been described as inhibitors of the adherence of cancer cells, migration and tumor growth. The goals of this study were to characterize the antitumoral effect of Leuc-B on breast tumor cells: MCF7 and Ehrlich. The cells were grown in culture medium DMEM with 10% fetal bovine serum and 1% of penicillin and kept in humid atmosphere with 5% of CO₂ at 37°C. In order to examine the cytotoxic effect, cells were treated with increasing concentrations of Leuc-B and crude venom for 48 h. Metabolic viability was evaluated by MTT assay and alterations in chromosomal DNA were analyzed by DAPI staining. The results showed that both *B.leucurus* crude venom (BLV) and Leuc-B evoked dose-dependent cytotoxic effect on breast tumor cells. BLV presented IC₅₀ of 8.00 ± 0.04 µg/mL and 4.0 ± 0.03 µg/mL against MCF7 and Ehrlich cells, respectively. Similarly to BLV, Leuc-B was more potent for MCF7 cells (IC₅₀: 1 µM) than Ehrlich cell (IC₅₀: 0.35 µM). Interestingly, Leuc-B was more potent than cisplatin, an antineoplastic drug widely used in clinic. Our results reveal the high antitumor potential of Leuc-B. Further studies are in development in order to evaluate the therapeutical index of Leuc B as well as the spectrum of antineoplastic effect.

Support: FAPEMIG, CNEN, CNPq CAPES

Keywords: Snake venom, metalloprotease, disintegrin, tumors

ANEXO 5 - TRABALHO COMPLETO
INTERNATIONAL NUCLEAR ATLANTIC CONFERENCE, 2009

**RADIOIODINATION AND BIODISTRIBUTION OF LEUCUROLYSIN-B
ISOLATED FROM *BOTHROPS LEUCURUS* IN MICE BEARING EHRlich**

Gabriel, L.M.¹; Sanchez, E.O.F.²; Silva, S.G.²; Soares, M.A.¹; Bicalho, M.S.¹; Santos, R.G.¹

¹Development Center of Nuclear Technology, BH, MG, Brazil
Avenida Presidente Antônio Carlos, 6.627,
31270-901 Campus da UFMG - Pampulha - Belo Horizonte/MG
lucilenegabriel@hotmail.com
santosr@cdtn.br

²Ezequiel Dias Foundation, BH, MG, Brazil
Rua Conde Pereira Carneiro, 80
30510-010 Belo Horizonte, MG
silea@funed.mg.gov.br
eladio@funed.mg.gov.br

Although few advances in the diagnosis and therapy were obtained, knowledge of the cancer have grown considerably. Faced with this scenario, it is clear the need for new substances which have low toxicity to the patient, which can be used for diagnosis and treatment of cancer. The integrins are a superfamily of cell adhesion receptors that recognize mainly extracellular matrix ligands and cell-surface ligands, although some soluble ligands have been identified. They were initially identified as key cell-surface adhesion receptors mechanically linking the cytoskeleton to the extracellular matrix or to other cells during cell migration and tissue invasion. They were later recognized as cell signaling receptors that influence various cellular events, including cell proliferation. Not surprisingly, various integrins have been identified as regulators of tumor progression, first in tumor cell invasion and metastasis, then in angiogenesis. Cell adhesion to the ECM (extracellular matrix) is partially mediated by the binding of integrin to an integrin-recognition RGD motif found in some ECM components such as fibronectin, vitronectin and fibrinogen. This motif is also found in a group of small cysteine-rich proteins found in some snake venoms named disintegrins. Disintegrins inhibit cell-matrix and cell-cell interactions mediated by integrins. Some disintegrins have also been shown to inhibit experimental metastasis as an integrin-dependent process, and therefore, over the last few years, many studies have focused on these proteins. The disintegrin-like (ECD), as well as RGD-disintegrin binds to cell surface integrins evoking inhibition of cell adherence to the natural ligands and inhibition of platelet aggregation. Leucurolysin-B (Leuc-B) is a metalloproteinase class P-III isolated from *Bothrops leucurus* (BLV) and possesses a disintegrin-like domain (ECD). The goals of this work were to synthesize a radioactive probe analog to Leuc-B using radioiodine ¹²⁵I, and evaluate the interaction of ¹²⁵I-Leuc-B in tumor cells through the study of biodistribution in animals bearing Ehrlich tumor. ¹²⁵I-Leuc-B was synthesized using lactoperoxidase with high yield (90%) and specific activity of 1.2x10⁷ Bq/mmol. For the evaluation of Leuc-B radiopharmaceutical potential ¹²⁵I-Leuc-B was intravenously injected in Ehrlich tumor mice model and the biodistribution profile was evaluated after different time post injection (2, 10, 30, 60, 180, 360 and 1440 minutes). After dissection and washing the radioactivity in each organ was determined in the gamma counter. It was observed that ¹²⁵I-Leuc-B had very fast clearance from the blood stream (T_{1/2}= 0.01 h). Tumor uptake of ¹²⁵I-Leuc-B gradually increased up to (2 min) and remained for a quite long period. The tumor/normal tissue uptake ratios of ¹²⁵I-Leuc-B were 1.77 (tumor/normal paw) and 8.44 tumor/skeletal muscle. The results suggest that ¹²⁵I-Leuc-B may constitute a good template for development of a tool for detection of solid tumors. Toxicological studies in vivo are in development to assess the safety of the use of Leuc-B.

Support: FAPEMIG, CNEN, CNPq CAPES

ANEXO 6 - RESUMO

**V CONGRESO LATINOAMERICANO DE FISICA MÉDICA
III CONGRESO PERUANO DE FISICA MÉDICA
Encuentro Iberoamericano de Física Médica, 2010**

16 a 20 de maio 2010

----- Mensagem Original -----
Assunto: Re: Envio Inscripcion
De: "Alfim Congreso" <alfim_congreso@yahoo.com>
Data: Sex, Janeiro 8, 2010 2:20 pm
Para: "Raquel Gouvea Dos Santos" <santosr@cdtn.br>

Estimados Lucilene MArcia Gabriel, Eladio Flores Sanchez, Raquel Gouvêa dos Santos:

Reciban nuestros cordiales saludos, su trabajo: 131I-Leucurolisin-B INTERNAL DOSIMETRY:ANIMAL MODEL AND HUMAN EXTRAPOLATION. Ha sido recibido con conformidad, el cual esta siendo enviado al Comité Científico para su respectiva evaluación.

Atte.

Comité
Organizador (CUSCO 2010):

ANEXO 7 - RESUMO**10TH MEETING OF THE PAN AMERICAN SECTION OF THE
INTERNATIONAL SOCIETY ON TOXINOLOGY (IST)**

Costa Rica
18 a 22 de abril de 2010

De: santosr@cdtn.br <santosr@cdtn.br>
Assunto: abstract submission
Para: abstractspanam.icp@ucr.ac.cr
Cc: lucilene_gabriel@yahoo.com.br
Data: Sexta-feira, 29 de Janeiro de 2010, 18:56

Dear Sir

Please find attached the abstract : EVALUATION OF THE ANTITUMORAL EFFECT
OF LEUCUROLYSIN-B ISOLATED FROM BOTHROPS LEUCURUS ON TUMOR CELLS, authors:
Lucilene M. Gabriel, Eladio F. Sanchez Siléia G. Silva, Raquel G.
Santos (presenting author) for poster presentation.

Yours,

Raquel Gouvea Dos Santos

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](#)