



Universidade Federal de Uberlândia

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**AVALIAÇÃO “*IN VITRO*” DO EFEITO ANTITUMORAL E ANTIANGIOGÊNICO
DE UMA METALOPROTEASE ISOLADA DA PEÇONHA DE *BOTHROPS
PAULOENSIS***

DENISE DE OLIVEIRA GUIMARÃES

MESTRADO 2016



Universidade Federal de Uberlândia

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**AVALIAÇÃO “*IN VITRO*” DO EFEITO ANTITUMORAL E ANTIANGIOGÊNICO DE
UMA METALOPROTEASE ISOLADA DA PEÇONHA DE *BOTHROPS
PAULOENSIS***

Denise de Oliveira Guimarães

Orientadora: Prof^a Dr^a Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Co-orientadora: Dr^a Daiana Silva Lopes

UBERLÂNDIA – MG

2016

DENISE DE OLIVEIRA GUIMARÃES

**AVALIAÇÃO “*IN VITRO*” DO EFEITO ANTITUMORAL E ANTIANGIOGÊNICO DE
UMA METALOPROTEASE ISOLADA DA PEÇONHA DE *BOTHROPS***

PAULOENSIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Co-orientadora: Dr^a Daiana Silva Lopes

UBERLÂNDIA – MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

G963a
2016

Guimarães, Denise de Oliveira, 1970

Avaliação “in vitro” do efeito antitumoral e antiangiogênico de uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* / Denise de Oliveira Guimarães. - 2016.

105 p. : il.

Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.

Coorientadora: Daiana Silva Lopes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas - Teses. 2. Mamas - Câncer - Teses. 3. Metaloproteínas - Teses. 4. Agentes antineoplásicos - Teses. I. Ávila, Veridiana de Melo Rodrigues. II. Lopes, Daiana Silva. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

Denise de Oliveira Guimarães

Avaliação “*in vitro*” do efeito antitumoral e antiangiogênico de uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr^a. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila - UFU

Examinadores:

Dr^a. Luciana Machado Bastos - FUPAC

Dr^a. Cássia Regina Alves - UFU

Aprovada em: 16 de Setembro de 2016.

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PPGCS para o formato da Dissertação foram contempladas.

Prof^a Dr^a Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Hilda por ser a pessoa que mais me apoia e acredita na minha capacidade. Você com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação esteve ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada por ser minha mãe! Meu agradecimento pelas horas em que ficou ao meu lado não me deixando desistir e me mostrando que sou capaz de chegar onde desejo, sem dúvida foi quem me deu o maior incentivo para conseguir concluir esse mestrado; nunca desistiu da sua filha.

Ao meu marido amado Wagner, por suportar a minha ausência em nosso lar para que eu concluísse esta etapa. Sem seu apoio eu não teria conseguido. Obrigada por sua presença silenciosa e forte em todo este tempo e pelo compartilhamento dos nossos sonhos, planos, dores e vitórias.

Às minhas filhas Mariana e Anaisa, vocês são o melhor de mim. Somente por vocês eu luto para ser melhor a cada dia.

A minha avó Maria, por estar sempre rezando para que meus objetivos sejam alcançados, por todo o amor que me dedicou meu eterno amor e agradecimento.

Ao meu querido pai (*in memorian*) Edison Lasmar com muito carinho e saudade. Pessoa que com gestos, expressões e atitudes me transmitiu valiosos ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, que me carregou quando faltaram forças, por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais, que não mediram esforços em me ajudar durante a realização desse mestrado e dessa dissertação.

À Dr^a Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, por acreditar que eu era capaz e pela orientação. Você me abriu as portas, como uma mãe que abre os braços para receber um filho. Só tenho a agradecer aos seus ensinamentos, orientações, palavras de incentivo, paciência e dedicação. Você é uma pessoa ímpar, onde busco inspiração para me tornar melhor em tudo que faço e farei daqui para frente. Tenho muito orgulho em dizer que um dia fui sua orientada.

À Fernanda, amiga, companheira, irmã que eu escolhi! Digo que você é a primeira autora desse trabalho tamanha foi sua colaboração. Você foi os meus braços quando não pude trabalhar, meu raciocínio quando não mais conseguia pensar, minha grande amiga em todas as horas, tanto as boas como as mais difíceis durante esse tempo, dentro e fora do laboratório... não tenho palavras para agradecer todo seu companheirismo e dedicação! Amo muito você!

À minha querida Dr^a Daiana ou somente Dai... Quanto você me ensinou! Tudo não é mesmo! Também não seria possível a realização desse trabalho sem você! Obrigada por toda sua ajuda na cultura, no artigo, na análise dos resultados. Obrigada por acreditar tanto em mim! A melhor co-orientadora que eu poderia ter!

À Dr^a Renata, Rê obrigada por me receber de braços abertos neste laboratório que também é seu! Por suas orações, companheirismo, ensinamentos e todo crédito que me deu! Você representa tudo que eu quero ser um dia! Costumo dizer que quero ser igual a você quando crescer!

À Dr^a Kelly, obrigada pela convivência diária e por toda sua colaboração na elaboração desse trabalho.

À “Fror”, Sarah obrigada pela amizade e ajuda em tantos experimentos, me ensinou a usar o excell. Você teve uma participação ímpar na minha passagem pelo laboratório!

Aos amigos do LaBiTox, Mônica, Maks, David, Lucas, Vitor, Eloá, Patrícia, Paulo, obrigada por conviver com vocês diariamente sorrindo sempre fazendo os meus dias mais leves. Vocês foram muito importantes nessa caminhada!

Às queridas técnicas do LaBiTox Marina e Tianinha por todo carinho, atenção, solidariedade, sempre a postos para ajudar no que quer que precisássemos!

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo e o Laboratório de Nanobiotecnologia por abrir as portas do laboratório para realização de alguns experimentos. Agradeço à Drª Lara Vecchi, Mariana, Patrícia Terra, Drª Paula, pela ajuda e colaboração nesse trabalho.

As secretárias do PPGCS Gisele e Viviane, obrigada pela amizade e pela disposição em ajudar sempre, recebam meu sincero agradecimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo custeio dessa pesquisa.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para realização desse trabalho.

Buscai as coisas do Alto.

Não podemos ter medo de sonhar com grandes ideais.

Triste de quem se acomoda e se apequena com reduzidos propósitos.

A vida é feita de grandes projetos.

O ser humano é chamado para grandes ideais.

Os grandes sonhos nos dão força para superarmos os pequenos e grandes
obstáculos.

Pe. Léo, scj

Resumo

O câncer de mama é uma neoplasia altamente maligna e continua a ser a segunda principal causa de mortalidade entre as mulheres. Os efeitos antitumoriais de metaloproteinases e desintegrinas de veneno de serpentes têm sido investigados em vários tipos de células tumorais. Neste estudo, foram avaliados os efeitos antitumoriais e anti-angiogênicos induzidos pela Bothropoidina, uma metaloproteinase desintegrina-like isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* em células de câncer de mama humano MDA-MB-231 e células endoteliais. Após 24 horas de tratamento com 100 μ g/mL de Bothropoidina foi constatado um efeito citotóxico moderado de 30% em MDA-MB-231 contra 10% de citotoxicidade em MCF10A (uma linha de células da mama não tumorigênica), uma diferença significativa que sugere uma possível preferência desta proteína por alvos em células tumorais. Observou-se apoptose e apoptose tardia após tratamento com Bothropoidina (10 μ g/mL e 40 μ g/mL) em células MDA-MB-231. Além disso, esta toxina não só inibiu a adesão de células MDA-MB-231 de uma forma dose dependente, como a migração celular em aproximadamente 45%. Bothropoidina reduziu a viabilidade e adesão de células endoteliais em Matrigel e inibiu a angiogênese in vitro estimulada por bFGF em Matrigel, mostrando um número de vasos formados significativamente menor em relação ao controle. Os resultados demonstraram que Bothropoidina tem um potente efeito antitumoral e antiangiogênico in vitro, representando uma ferramenta biotecnológica para elucidar o efeito antitumoral de metaloproteinases desintegrinas-like em células cancerígenas.

Palavras-chave: metaloproteinase de peçonha de serpente, células MDA-MB-231, antitumoriais, anti-angiogênicos.

Abstract

Breast cancer is a highly malignant carcinoma and remains the second leading cause of mortality among women. The antitumor effects of metalloproteinases and disintegrins from snake venom on various types of cancer cells have been investigated. In this study, we evaluated the antitumor and antiangiogenic effects on MDA-MB-231 human breast cancer cells and endothelial cells induced by Bothropoidin, a disintegrin-like metalloproteinase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. At 24h after treatment at 100 μ g/mL, Bothropoidin exerted a moderate cytotoxic effect of 30% on MDA-MB-231 versus 10% cytotoxicity against MCF10A (a non-tumorigenic breast cell line), a significant difference that suggests a possible preference by this protein for targets in cancer cells. Early and late apoptosis of MDA-MB-231 was observed after Bothropoidin treatment (10 μ g/mL and 40 μ g/mL). Furthermore, this toxin inhibited not only the adhesion of MDA-MB-231 cells in a dose-dependent manner but also cell migration by approximately 45%. In addition, Bothropoidin decreased endothelial cells viability and adhesion in Matrigel and inhibited *in vitro* angiogenesis in Matrigel stimulated by bFGF, showing significantly fewer formed vessels. The results demonstrated that Bothropoidin has potent *in vitro* antitumor and antiangiogenic effect and represents a biotechnological tool for elucidating the antitumor effect of disintegrins-like metalloproteinases in cancer cells.

Key words: snake venom metalloproteinase, MDA-MB-231 cells, antitumor, antiangiogenic.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| ADP | Adenosina Difosfato |
| Ais | Inibidores de Aromatase |
| AIF | Fator Indutor de Apoptose |
| ABNT | Associação Brasileira de Normas Técnicas |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| bFGF | Fator de Crescimento Fibroblástico Básico |
| dATP | Deoxi Adenosina Trifosfato |
| DD | Death Domain |
| DED | Death Effector Domain |
| DISC | Death Inducing Signalling Complex |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid |
| ECM | Matriz Extra Celular |
| EGFR | Fator de Crescimento Epidérmico |
| EMT | Mecanismo de Transição Epitélio Mesenquimal |
| EndoG | Endonuclease G |
| HER2 | Human Epidermal Growth Factor-type 2 |
| HIF | Fator Indutor de Hipóxia |
| HTRA2 | Serinoprotease de Alta Temperatura |
| HUVECs | Human Umbilical Vein Endothelial Cells |
| kDa | Kilo Dalton |
| KI67 | Taxa de Divisão Celular |
| MB | Membrana Basal |
| MMPs | Matrix Metaloprotease |
| ON | Óxido Nítrico |
| PCR | Reação em Cadeia de Polimerase |
| PI3K | Fosfatidilinositol-3-quinase |
| PI3P | Fosfatidilinositol-3-fosfato |
| pVHL | Proteína supressora tumoral Von Hippel-Lindau |
| SERMs | Moduladores Seletivos do Receptor de Estrogênio |

| | | |
|------------------------------|-------|--|
| RE | | Receptor de Estrogênio |
| RGD | | Arginina, Glicina e Aspartato |
| RP | | Receptor de Progesterona |
| ROS | | Espécies Reativas de Oxigênio |
| SVMP | | Snake Venom Metalloproteasis |
| t-End | | Endothelial Cell Timus |
| TP | | Tempo de Protrombina |
| TTPa | | Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada |
| TGFβ | | Fator de Transformação do Crescimento |
| ULK1 | | Complexo Serina/Treonina Quinase |
| VEGF | | Fator de Crescimento Endotelial Vascular |
| WHO | | World Health Organization |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

| | | |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Classificação das SVMPs..... | 42 |
| Tabela1 | Genes envolvidos na transformação neoplásica..... | 20 |

Capítulo 2

| | | |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Analysis of cytotoxicity of Bothropoidin on MDA-MB-231 and MCF10A cells by MTT assay..... | 92 |
| Figura 2 | Analysis of apoptosis by flow cytometry of MDA-MB-231 cells..... | 93 |
| Figura 3 | Effect of Bothropoidin on adhesion of MDA-MB-231 cells..... | 94 |
| Figura 4 | Effect of Bothropoidin on cell migration of MDA-MB-231..... | 95 |
| Figura 5 | Effect of Bothropoidin on viability and adhesion of tEnd cells in Matrigel..... | 96 |
| Figura 6 | <i>In vitro</i> anti-angiogenic effect of Bothropoidin..... | 97 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| APRESENTAÇÃO..... | 14 |
| CAPÍTULO 1..... | 17 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 18 |
| 1.1 Câncer: Epidemiologia..... | 18 |
| 1.2 Carcinogênese..... | 19 |
| 1.3 Morte celular..... | 24 |
| 1.4 Invasão Celular e Metástase..... | 28 |
| 1.5 Angiogênese e Angiogênese Tumoral..... | 30 |
| 2 CÂNCER DE MAMA..... | 33 |
| 2.1 Prevenção, principais tratamentos e diagnóstico do câncer de mama..... | 35 |
| 3 METALOPROTEASES DE PEÇONHA DE SERPENTES (SVMPs)..... | 41 |
| 4 Objetivos..... | 46 |
| 4.1 Objetivo geral..... | 47 |
| 4.2 Objetivos específicos..... | 47 |
| REFERÊNCIAS..... | 48 |
| CAPÍTULO 2..... | 75 |
| 5 ARTIGO: <i>In vitro</i> antitumor and antiangiogenic effects of Bothropoidin, a metalloproteinase from <i>Bothrops pauloensis</i> snake venom..... | 76 |
| Abstract..... | 77 |
| 1 Introduction..... | 78 |
| 2 Materials and methods..... | 80 |

| | | |
|-----|----------------------------------|----|
| 2.1 | Venom..... | 80 |
| 2.2 | Bothropoidin purification..... | 80 |
| 2.3 | Cell culture..... | 81 |
| 2.4 | Cell viability..... | 81 |
| 2.5 | Apoptosis assay..... | 82 |
| 2.6 | Cell adhesion assay..... | 82 |
| 2.7 | Wound-healing assay..... | 83 |
| 2.8 | In vitro angiogenesis assay..... | 83 |
| 2.9 | Statistical analysis..... | 84 |
| 3 | Results and Discussion..... | 84 |
| 4 | Conclusion..... | 89 |
| 5 | Caption of figures..... | 90 |
| 6 | References..... | 98 |

APRESENTAÇÃO

O câncer de mama é uma doença multifacetada, que se apresenta em múltiplos subtipos moleculares e cada um com uma evolução clínica singular e tratamento específico. Uma das principais complicações da doença é o surgimento de metástase, evento que leva a alterações fenotípicas e no perfil genético da doença. Segundo estimativas da GLOBOCAN - International Agency for Research on Cancer, ocorreram aproximadamente 1,7 milhões de casos de câncer de mama em 2012 com 522 mil mortes no mundo. No Brasil, para 2016, são esperados 57.960 novos casos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres.

A quimioterapia, tratamento sistêmico do câncer de mama, visa à destruição das células neoplásicas. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos são inespecíficos, lesando tanto células malignas quanto normais. Dentre os tratamentos sistêmicos existentes destaca-se o emprego de drogas citotóxicas, terapia-alvo com anticorpos monoclonais e bloqueadores de proteínas, terapia anti-hormonal ou a associações de duas ou mais terapias. Devido aos múltiplos subtipos tumorais o tratamento configura-se uma busca contínua a soluções para a complexidade de cada tipo da doença.

A procura de novas drogas oncológicas originadas de moléculas bioativas é um dos objetivos da pesquisa biotecnológica. Diversos compostos procedentes da extração e purificação de toxinas de peçonhas ofídicas têm demonstrado interessantes efeitos farmacológicos. Essas peçonhas são constituídas de diferentes componentes como proteínas e peptídeos. Dentre estes destacam-se as metaloproteases, fosfolipases A₂, serinoproteases, hialuronidases, L-aminoácido oxidases, peptídeos potencializadores de bradicinina e desintegrinas. Diversas proteínas e peptídeos isolados de peçonhas ofídicas possuem ações farmacológicas tais como hipotensão, inflamação, ativação ou inibição da coagulação sanguínea, agregação plaquetária, entre outros exemplos. Diante de tais efeitos é de grande interesse estudar o potencial dessas proteínas e suas possíveis aplicações práticas como agentes farmacêuticos.

Metaloproteases de peçonhas ofídicas (SVMP) são enzimas capazes de iniciar eventos hemorrágicos, levar alterações na coagulação sanguínea, interagir com os principais componentes da matriz extracelular tais como colágeno, laminina

e fibronectina. São proteínas com muitos domínios que podem gerar, por meio de autoproteólise, produtos biologicamente ativos efetivos no tratamento antitumoral.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antitumoral e antiangiogênico de Botropoidina, uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* em células de linhagem tumoral (MDA-MB-231) e endotelial (t-End). Esta toxina foi isolada e caracterizada por Gomes e colaboradores em 2014. Serão apresentados resultados quanto ao seu efeito na migração, viabilidade e adesão celular bem como nos mecanismos de apoptose e angiogênese, fatores fundamentais para o estabelecimento e desenvolvimento tumoral.

A apresentação desta dissertação foi realizada seguindo as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia e da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), sendo dividida em dois capítulos. O capítulo 1 apresenta uma revisão bibliográfica sobre o tema Câncer enfatizando os principais aspectos relacionados à epidemiologia, carcinogênese, subtipos moleculares, mecanismos moleculares (morte celular, migração, invasão, metástase e angiogênese) e principais tratamentos, bem como o potencial antitumoral de componentes presentes em peçonhas ofídicas, principalmente as metaloproteases de serpentes (SVMPs). O capítulo 2 apresenta os resultados da pesquisa em formato de artigo científico intitulado: “*In vitro antitumor and antiangiogenic effects of Bothropoidin, a metalloproteinase from Bothrops pauloensis snake venom*” que foi publicado na revista INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, Volume 97, Abril 2017, Páginas 770-777, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.064>.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer: Epidemiologia

A palavra câncer possui etimologia grega, é a tradução latina da palavra carcinoma: *karkinos*, que significa crustáceo/caranguejo. Galeno, aproximadamente 138-201 anos d.C. foi a primeira pessoa a utilizar o termo. A doença foi detectada em múmias egípcias, fato este que comprova que não é uma enfermidade recente, comprometendo o homem há séculos (SALAVERRY, 2013). A denominação câncer é um termo generalizado usado para intitular as enfermidades neoplásicas malignas reconhecidas por um desordenado crescimento celular, resultando em mutações genéticas nas células acometidas, originando assim um processo de oncogênese (HANAHAN; WEINBERG, 2000; SORLIE, 2004).

A doença é atualmente um problema de saúde pública mundial em razão de muitos fatores, tais como sua alta incidência, prevalência, mortalidade, alto custo hospitalar e consequências para os pacientes, atingindo milhões de pessoas no mundo inteiro. Embora haja queda do número de óbitos para alguns tipos da doença, a taxa de mortalidade global por câncer tem aumentado nas últimas décadas. Segundo estimativas da GLOBOCAN - *International Agency for Research on Cancer*, aproximadamente seis milhões de pessoas morrem anualmente por câncer no mundo, podendo atingir 22 milhões até 2034. A agência internacional de pesquisas em câncer da *World Health Organization* (WHO), responsável pela publicação do Relatório Mundial do Câncer em 2014 declarou que os casos da doença aumentam em um ritmo célere. Em sua última publicação destaca o câncer de pulmão como primeiro lugar no número de casos, com 1,8 milhões de registros que representa 13% do total no mundo. Em seguida, o câncer de mama, com 1,7 milhões de casos sendo 11,9% desse total e o tumor de cólon, que atingiu 1,4 milhões de pessoas chegando a 9,7% do total mundial (FERLAY et al., 2015; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015; WHO, 2015).

No Brasil a estimativa para o biênio 2016-2017, prevê cerca de 600 mil casos novos de câncer, sendo aproximadamente 180 mil novos casos de câncer de pele

não melanoma e cerca de 420 mil novos casos de outros tipos de câncer. Os tipos mais frequentes em homens serão próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, câncer de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) (INCA, 2015).

O câncer de mama é o mais comum entre as mulheres, e responde por 22% dos casos novos anuais. No Brasil, para 2016, são esperados 57.960 novos casos, com um risco calculado em cerca de 56 ocorrências a cada 100 mil mulheres. Estima-se que, para cada 100 mulheres com câncer de mama, apenas um homem terá a doença (INCA, 2015). Óbitos em decorrência do câncer de mama que se referem à população mundial apresenta uma curvatura crescente e representa a primeira causa de morte por câncer na população feminina brasileira, com 12,66 mortes/100.000 mulheres em 2013. Sendo que as regiões Sul e Sudeste são as que apresentam as taxas mais elevadas, com 14,25 e 13,70 mortes/100.000 mulheres em 2013, respectivamente (BRASIL, 2015).

1.2 Carcinogênese

A carcinogênese é um processo de múltiplos passos, no qual as alterações genéticas e cromossômicas acumulam-se em uma célula, dando origem ao desenvolvimento tumoral. Tais alterações genéticas podem ocorrer em duas classes gênicas, denominadas genes reguladores do crescimento: os proto-oncogenes responsáveis pelo crescimento celular e os genes de supressão tumoral os quais atuam inibindo o crescimento celular (ELENBAAS et al., 2001; HOSNY et al., 2016).

Proto-oncogenes quando sofrem uma mutação gênica somática (translocação, amplificação ou mutação pontual) tornam-se eventualmente oncogenes. Oncogenes são genes relacionados ao surgimento de tumores malignos ou benignos, bem como genes que quando deixam de funcionar normalmente, transformam uma célula normal em célula cancerosa (SERRANO; THEODORO; DA SILVA PINHAL, 2014).

Alguns dos oncogenes, genes supressores de tumores e genes de reparo do DNA envolvidos diretamente com a carcinogênese, estão representados na Tabela 1.

| GENE | Função Normal | TIPO DE CÂNCER RELACIONADO |
|-----------------------------------|--|----------------------------|
| ONCOGENES | | |
| B-RAF | Sinalização intracelular | Melanoma |
| HER-2 | Receptor de fator de crescimento | Câncer de mama |
| MYC | Fator de transcrição | Neuroblastoma |
| RAS | Sinalização intracelular | Câncer colorretal |
| VEGF | Promotor da angiogênese | Colorretal metastático |
| GENES SUPRESSORES DE TUMOR | | |
| APC | Regula divisão, migração celular | Câncer colorretal |
| CDKN2A | Regula a divisão celular | Melanoma |
| RB | Regula a divisão celular | Retinoblastoma |
| TP53 | Regula a divisão celular e apoptose | Câncer de pulmão |
| VHL | Regula a divisão celular e angiogênese | Câncer renal |
| GENES DE REPARO DO DNA | | |
| ATM | Reparo do DNA | Leucemia |
| BRCA1/2 | Reparo do DNA | Câncer de mama |
| MLH1 | Reparo do DNA | Câncer colorretal |
| MSH2 | Reparo do DNA | Câncer colorretal |
| XPA | Reparo do DNA | Câncer de pulmão |

Tabela 1 - Genes envolvidos na transformação neoplásica – Adaptada de (SERRANO et al., 2014).

Segundo Pierotti e colaboradores 2003, três mecanismos genéticos ativam oncogenes resultando na alteração estrutural e no aumento da sua expressão em neoplasias humanas: (1) mutação espontânea, (2) amplificação gênica, e (3) rearranjos cromossômicos (BARRETT, 1993; MARGAN et al., 2016; PIEROTTI; SOZZI; CROCE, 2003).

Mutações espontâneas: Estas alterações são promovidas por agentes cancerígenos que podem originar danos no DNA e ativar oncogenes, que participam da transformação neoplásica. Os oncogenes serão traduzidos a oncoproteínas que integram vários mecanismos celulares como proliferação, diferenciação, migração, adesão, controle de apoptose e reparo do DNA, entre outros. Entretanto, as oncoproteínas executam de maneira alterada tais funções celulares. Deste modo, essas células podem apresentar erros nestes mecanismos, desencadeando assim a transformação de células normais em tumorais (MARGAN et al., 2016; PIEROTTI et al., 2003; SERRANO et al., 2014; WEINBERG, 1989).

Amplificação gênica: Neste processo há uma reduplicação do DNA, produzindo várias cópias de proto-oncogenes nas células tumorais, conferindo às neoplasias um perfil mais agressivo. Esta amplificação gênica não gera produtos mutados, simplesmente o aumento da expressão de proteínas específicas induz a geração de oncoproteínas com alto potencial tumoral (MARGAN et al., 2016; PIEROTTI et al., 2003; SERRANO et al., 2014; WEINBERG, 1989).

Rearranjos cromossômicos: Há o rearranjo do material genético por inserção ou translocação cromossômica, resultando no aumento da expressão de proto-oncogenes. Estes rearranjos genéticos podem gerar oncogenes e, consequentemente, oncoproteínas induzindo a transformação neoplásica (MARGAN et al., 2016; PIEROTTI et al., 2003; SERRANO et al., 2014; WEINBERG, 1989).

Uma vez que a neoplasia é um processo de múltiplos passos, mais de um destes mecanismos contribuem frequentemente para a gênese tumoral por alteração do número de genes associados ao câncer (BARRETT, 1993; HOSNY et al., 2016; WEINBERG, 1989).

O crescimento normal de qualquer tipo de tecido acontece devido a um perfeito equilíbrio entre as vias de sinalização da célula, que são responsáveis pelo controle do metabolismo celular e da homeostase tecidual. A transdução de sinal acontece por intermédio destas vias, que em geral constituem-se por proteínas que participam na regulação dos múltiplos eventos da fisiologia celular tais como, proliferação, migração, diferenciação, mecanismos pró e antiapoptóticos, etc. A desregulação de qualquer uma dessas vias, frequentemente ocasionada por aumento/diminuição da atividade ou expressão de seus componentes proteicos,

induz ao desequilíbrio dos eventos fisiológicos celulares desencadeando a carcinogênese (ARRUDA MACEDO; FOX; DE SOUZA CASTRO, 2015; AVRAAMIDES; GARMY-SUSINI; VARNER, 2008; SOUZA et al., 2014).

A célula maligna tem uma elevada aptidão na captação de aminoácidos e síntese de proteínas, seu metabolismo é totalmente dirigido para se obter rapidamente grande quantidade de energia para manter a elevada taxa de divisão celular. Possuem alta atividade glicolítica e produz a maior parte do ATP por ela usado. Possuem também expressão de moléculas de adesão em sua membrana como as integrinas que tem grande importância em processos fisiológicos e patológicos tais como divisão, migração e diferenciação celular, e que atuam como receptores para vários componentes da matriz extracelular tais como laminina, fibronectina e colágeno que são essenciais para a proliferação e desenvolvimento das células cancerígenas (BARRETT, 1993; CALDON; SUTHERLAND; MUSGROVE, 2010; DEBERARDINIS et al., 2008; HARPER et al., 2013; LU; TAN; CAI, 2015; NELSON, 2011).

De acordo com (ALMEIDA et al., 2005) a carcinogênese pode demorar anos, é um processo que passa por várias etapas até finalmente transformar-se em tumor (DÓRIA, 2015; FERNANDES MORAIS et al., 2014). Essas mudanças podem ser divididas e são descritas em três etapas distintas: iniciação, promoção e progressão (BISSELL; HINES, 2011; HAFEEZ et al., 2016; MIYAGI et al., 2015).

Na iniciação do processo oncogênico dá-se a ativação de proto-oncogenes (alguns dos principais representados na Tabela 1) que são ditos supressores tumorais, onde, *a priori* estão inativos em células normais e quando ativados são transformados em oncogenes. Esses genes são os principais promotores da multiplicação celular desordenada, e são cruciais no efeito de malignização. Os promotores tumorais tem ação em pontos chave do ciclo celular, ocasionando uma mudança nos mecanismos celulares naturais (ALMEIDA et al., 2005; ARRUDA MACEDO et al., 2015; TANAKA et al., 2013; VINCENT; GATENBY, 2008; WARD, 2002).

A etapa da promoção é definida como um processo de expansão celular sendo iniciada por clonagem e resultando na geração de um tumor potencialmente maligno. Nessa fase as células que passaram por modificações na etapa inicial,

passam por novas transformações e essas acontecem de maneira lenta e gradativa. Os agentes promotores atuam sobre as células em um determinado espaço de tempo, se por acaso acontecer uma pausa do agente, pode sobrevir à extinção desse processo. A angiogênese nesse momento assume um papel crucial na evolução tumoral, uma vez que é essencial para fornecer ao tumor oxigênio e nutrientes sanguíneos, além de ser uma maneira eficaz na remoção de substâncias nocivas (ALMEIDA et al., 2005; ARRUDA MACEDO et al., 2015; TANAKA et al., 2013; VINCENT; GATENBY, 2008; WARD, 2002).

Na fase de progressão, acontece a chamada malignização tumoral devido à carga de alterações genéticas e epigenéticas, onde acontece o início da multiplicação celular desordenada. Nessa fase, os tumores exigem intensas adaptações celulares às condições do seu microambiente, como hipóxia e acidose. É a fase onde há o surgimento dos primeiros sinais clínicos da neoplasia (ALMEIDA et al., 2005; ARRUDA MACEDO et al., 2015; TANAKA et al., 2013; VINCENT; GATENBY, 2008; WARD, 2002).

Durante a fase de progressão tumoral pode acontecer simultaneamente a metástase que se caracteriza como um evento com vários estágios; é o processo em que as células malignas deixam o tumor inicial no sítio primário para invadir órgãos distantes. Os passos básicos que descrevem a metástase incluem migração, invasão, sobrevivência na circulação, adesão à parede vascular, extravasamento e, por fim, a difusão no novo tecido hospedeiro (APLIN; HOWE; JULIANO, 1999; MARTIN; CANO, 2010; VALASTYAN; WEINBERG, 2011).

A carcinogênese e o crescimento tumoral, portanto são processos multifatoriais que dependem de vários eventos moleculares que de uma forma geral podem envolver vias de morte celular, invasão, metástase e angiogênese, dentre outros processos (BISSELL; HINES, 2011; FELDING-HABERMANN et al., 2001; LEVENTAL et al., 2009).

1.3 Morte Celular

A condição de morte celular é conceituada como um evento fisiológico passivo e de natureza degenerativa, com a função de manter a homeostase celular, equilibrando a proliferação de células teciduais no processo de renovação celular e assim eliminando células lesadas e as supostamente ameaçadoras (KATAOKA; TSURUO, 1996). No entanto ela também pode ser induzida por circunstâncias patológicas como infecção, dano celular, e inexistência de fatores de crescimento. As consequências deste estímulo são: alterações na integridade da membrana plasmática, o aumento do seu volume e a perda das funções metabólicas celulares. Porém, nem todos os eventos de morte celular ocorrem de forma passiva. Ela também pode ser induzida em resposta ao estímulo de patógenos intra ou extracelulares (ELMORE, S., 2007; PAROLIN; REASON, 2001; SILVÉRIO DA SILVA, 2014).

De acordo com Grivicich et al 2007, a classificação da morte celular é dada em conformidade com suas peculiaridades bioquímicas e morfológicas e que correspondem a: apoptose, autofagia, necrose e senescênci. As possíveis mutações que podem ocorrer no arranjo dessas formas de morte celular podem dar origem a carcinogênese. A autofagia é um processo normal no crescimento celular que consiste em um catabolismo que origina a autodegradação da célula por meio dos lisossomos. Esse processo é finamente regulado e conduz a um perfeito funcionamento entre a síntese, a decomposição e o reaproveitamento dos produtos celulares (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; LORIN et al., 2013; SUN, 2016). A autofagia reage a uma variedade de estímulos, e na maioria dos casos protege as células contra situações de stress; é fundamental para a reciclagem lisossomal e de metabólitos para o citoplasma, como fonte de energia ou para promover a síntese de novas macromoléculas (KROEMER; MARIÑO; LEVINE, 2010; MIZUSHIMA; KOMATSU, 2011). Ao nível molecular, o primeiro passo do processo autófágico é a ativação de um complexo serina/treonina quinase (ULK1) regulado negativamente pelo gene mTORC1, integrante de múltiplas vias de sinalização que são sensíveis à disponibilidade de aminoácidos, ATP, fatores de crescimento e nível de espécies reativas do oxigênio (ROS) (LORIN et al., 2013; MIZUSHIMA; YOSHIMORI; OHSUMI, 2011). A ampliação, curvatura e fechamento dos autófagosomos são

controlados por um outro complexo molecular contendo fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e o gene Beclin 1, liberando a produção de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) e o consecutivo recrutamento de proteínas de ligação WIPI1/2 e dois sistemas de conjugação de ubiquitina-like ATG12-Atg5-ATG16L e LC3-PE. A fusão final com lisossomo carece de GTPases Rab e a proteína transmembrana LAMP2. Hidrolases ácidas e catepsinas presentes no lúmen do lisossomo degradam o conteúdo autofagossômico (LORIN et al., 2013; POLSON et al., 2010; SIMONSEN; TOOZE, 2009).

A necrose é uma forma de morte patológica e desordenada, onde as células sofrem danos que ocasionam a perda da permeabilidade da membrana, aumento do volume celular, condensação da cromatina, irregularidades no citoplasma, lesões celulares irreversíveis que levam a consequente morte celular. No decorrer do processo, há a liberação do conteúdo celular, danificando as células próximas e desencadeando resposta imunológica local. É um processo passivo em reação à injúria celular (NIKOLETOPOULOU et al., 2013; NUNES; BERNARDAZZI; DE SOUZA, 2014; VANLANGENAKKER et al., 2008).

A senescência é um processo ativo natural para o envelhecimento celular. As células senescentes cessam as atividades proliferativas após um número de fracionamento. É um processo de ordem genética que leva ao encurtamento dos telômeros e ao estímulo de genes supressores tumorais (GRIVICICH et al., 2007; GÜNTHER et al., 2003; KNIZHNIK et al., 2013; SCHMITT, C. A., 2007).

A apoptose é a morte celular geneticamente programada, que não leva a autólise. É um modo de autodestruição ordenado com propósito biológico estabelecido e que demanda ATP para a sua execução (HENGARTNER, 2000). Ela também pode ser desencadeada por uma grande variedade de condições de stress intracelulares como estímulo patológico não fisiológico, incluindo lesões ao DNA, stress oxidativo, sobrecarga citosólica de cálcio, citotoxicidade, acúmulo de proteínas no retículo endoplasmático e muitos outros. O processo de apoptose envolve uma série de alterações morfológicas da célula que leva à inativação e fragmentação dela, ao final do ciclo, os destroços celulares são fagocitados por macrófagos teciduais, não havendo extravasamento do conteúdo tóxico para o meio extracelular, portanto, não causa dano tecidual como a necrose

(FRAME et al., 2016; KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; KNIZHNIK et al., 2013; NUNES et al., 2014).

O mecanismo da apoptose pode acontecer através de dois tipos de vias: a extrínseca via dos receptores de morte e a intrínseca via mitocondrial. A via extrínseca abrange casos de morte celular por apoptose que são motivados por sinais de stress extracelulares identificados e difundidos por receptores transmembranares específicos que contêm um domínio extracelular de ligação ao ligante e um domínio intracelular citoplasmático denominado domínio de morte (DD, sigla do inglês *death domain*), sendo o mesmo fundamental para o acionamento do mecanismo apoptótico. (GALLUZZI et al., 2012; INDRAN et al., 2011; OUYANG et al., 2012).

A iniciação da via extrínseca depende da conexão dos receptores de morte fixados na superfície da membrana extracelular por um ligante específico como o FASL ao receptor FAS/CD95. O domínio de morte (DD) realiza a difusão do sinal, ativando os receptores e conduzindo ao recrutamento de proteínas adaptadoras com o DD e também com o domínio efetor de morte (DED, do inglês *death-effector domain*). Essa interação resulta no recrutamento de caspases iniciadoras, tal como a pró-caspase-8, formando o complexo de sinalização de indução de morte *death-inducing signalling complex* (DISC). O complexo DISC aciona a pro-caspase-8, transformando-a em caspase-8, que ativa caspases executoras clivando diretamente as pró-caspases-3, 6 e 7, acionando assim a via executora da apoptose. (INDRAN et al., 2011; REED, 1999; TOGNON; NUNES; CASTRO, 2013).

A via intrínseca é ativada por diversas situações de stress intracelular, como, danos ao DNA, hipóxia, privação de fatores de crescimento, radiação, ativação de oncogenes entre outros. Essas alterações provocam modificações na permeabilização da membrana mitocondrial externa, perda do potencial de membrana, interrupção da síntese de ATP, liberação de proteínas pro-apoptóticas e uma elevada produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (GALLUZZI et al., 2012; LI et al., 1997). Em relação às proteínas pro-apoptóticas liberadas, estas podem ser agrupadas da seguinte maneira: um grupo que induz apoptose numa via dependente de caspases, onde estão presentes o citocromo C, e uma serinoprotease de elevada temperatura (HTRA2); e outro grupo que induz apoptose numa via independente de caspases no qual estão incluídos o fator indutor de

apoptose (AIF) e a endonuclease G (EndoG) (INDRAN et al., 2011; MIYAMOTO et al., 2015; SANCHES JUNIOR et al., 2010).

As proteínas do primeiro grupo têm como principal papel inibir a função anti-apoptótica, o citocromo C liberado no citosol é integrante como co-fator e liga-se rapidamente a região C-terminal de uma proteína adaptadora (Apaf-1), esta interação facilita a ligação do dATP a pró-caspase 9 formando um complexo denominado apoptossomo e através da clivagem proteolítica da caspase 9 torna-se ativo e consecutivamente ativa outras caspases permitindo a progressão do processo apoptótico (MARUSAWA et al., 2003; WILLIAMS; COOK, 2015).

As proteínas do segundo grupo, o fator AIF e a EndoG, ao serem liberados pela mitocôndria são translocados para o núcleo e levam à fragmentação do DNA. A via mitocondrial da apoptose é finamente regulada pelos elementos da família Bcl-2. Esta família constitui-se por componentes anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 e Mcl-1) e pró-apoptóticos (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim, Hrk, Puma e Noxa) que comandam a liberação do citocromo C na mitocôndria. Essas proteínas são indutoras e repressoras de morte por apoptose e participam ativamente da regulação da mesma. O Bcl-2 e Bcl-XL inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo C e são chamados de reguladores antiapoptóticos. Já os genes Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas. Estímulos como dano ao DNA levam ao aumento das proteínas pró-apoptóticas e induzem a apoptose (ELMORE, S., 2007; GALLUZZI et al., 2012; INDRAN et al., 2011; OUYANG et al., 2012; WILLIAMS; COOK, 2015).

A homeostase tecidual não depende somente de fatores que regulam a sua proliferação e diferenciação, mas também de fatores que determinam e influenciam a sobrevivência e morte celular. A apoptose sendo um processo controlado geneticamente é suscetível à suspensão por mutações. Portanto, tornou-se evidente que a incapacidade celular de sofrer apoptose pode estar envolvida na patogênese de uma variedade de doenças humanas, tais como infecções virais, doenças auto-imunes e no câncer. (HENGARTNER, 2000; THOMPSON, 1995). A relação entre carcinogênese e desregulação da apoptose é tão próxima, que qualquer método de tratamento que estimule especificamente a apoptose em células tumorais podem ter potencial efeito antitumoral (BORNER et al., 1999; SHIMIZU et al., 2014).

1.4 Invasão celular e metástase

O mecanismo de invasão celular consiste em ultrapassar precisamente a controlada arquitetura do epitélio normal que figura como uma intrínseca barreira para a invasão. Para tanto, as células tumorais necessitam modificar suas propriedades genéticas, potencializando sua capacidade de crescimento irrestrito no tumor primário (HU et al., 2008; VALASTYAN; WEINBERG, 2011). Em seguida é necessário ativar o *Mecanismo de Transição Epitélio Mesenquimal* (EMT) que é controlado por fatores de transcrição que respondem a estímulos externos, tais como hipóxia e o TGF β Fator de Transformação do Crescimento (KLAUS; BIRCHMEIER, 2008; SOUZA et al., 2014). Estes elementos agem conjuntamente para desencadear alterações nos perfis de moléculas de superfície, tais como a perda de E-caderina e aumento de N-caderina ou vimentina, e a expressão de Metaloproteases de Matriz (MMPs) (YANG et al., 2004). Propriedades das células tumorais, tais como capacidade de migração e secreção de enzimas que destroem a Matriz Extra Celular (ECM), também estão associadas a este mecanismo. Estas características coletivamente conduzem as células tumorais a invadir o estroma circundante, alcançar o vaso sanguíneo, e intravasar para a circulação. (HUSEMANN et al., 2008). Ademais, a Membrana Basal (MB) também desempenha um papel crucial nos eventos de transdução de sinais no interior das células tumorais, iniciadas por meio das vias adesão célula-matriz mediadas por integrinas, levando a alterações na polaridade celular, proliferação, capacidade de invasão e sobrevivência (BISSELL; HINES, 2011).

A metástase é o último efeito de vários fatores que implicam na disseminação celular do tumor primário a órgãos distantes, na adequação ao microambiente diferente e na sobrevivência tumoral nesses novos tecidos ou órgãos (GUPTA et al., 2007; WEI et al., 2015). Podemos conceituar a metástase como sendo: "a transferência da doença de um órgão para outro não diretamente ligado a ele" (RÉCAMIER, 1829) apud (TALMADGE; FIDLER, 2010).

Uma visão alternativa ao padrão metastático foi proposta pela primeira vez por Paget no século 19, que postulou que células tumorais disseminadas podem formar metástases à medida que atingem um microambiente que é conveniente o suficiente para a sua sobrevivência e proliferação. Esta hipótese é conhecida como

“teoria semente-e-solo” e tem recebido amplo apoio na identificação de mediadores de genes que contribuem para a formação de metástases (FIDLER, I. J., 2003; JIN; MU, 2015; PENCHEVA et al., 2012).

A metástase se origina a partir de células neoplásicas que adquirem capacidade de propagação e conseguem deixar o tumor primário por intermédio de três vias: a linfática, circulatória, ou transcavitárias (também chamadas transcelômicas) por meio das cavidades corporais. (CHAFFER; WEINBERG, 2011; NGUYEN; BOS; MASSAGUE, 2009). Estas células tumorais perdem a adesão célula-célula, infiltram e sobrevivem na corrente circulatória burlando a vigilância imunológica, migram para os tecidos adjacentes danificando a membrana basal e a matriz extracelular e penetram o estroma local. Alguns tipos de neoplasias produzem quimioatraptores para plaquetas, fazendo com que as mesmas incorporem-se na superfície da célula tumoral, ocultando-a do sistema imunológico, fornecendo-lhes fatores de crescimento que contribuem na sobrevivência da célula tumoral na via circulatória (TALMADGE; FIDLER, 2010; WARD, 2002).

O processo de metástase é rigoroso e carece de habilidades especiais em cada etapa e a transformação do seu fenótipo, para haver sucesso no evento. As células normais apresentam proteínas transmembranares que proporcionam a adesão célula-célula, exercendo função significativa na integridade celular estrutural. Dentre as mais importantes estão as E-caderinas. Quando ocorrem mudanças nestas proteínas há a diminuição da adesão entre as células e o consecutivo deslocamento do tumor primário para as adjacências teciduais (CAVALLARO; CHRISTOFORI, 2004; GUPTA; MASSAGUE, 2006). Receptores de laminina e fibronectina também participam da invasão no tecido conjuntivo aderindo aos componentes da matriz extracelular. Integrinas são glicoproteínas de membrana que também são expressas por células tumorais em sua superfície fazendo a mediação da adesão célula-célula ou de célula-matriz extracelular. Para concluir a migração no tecido conjuntivo, as células metastáticas devem estar capacitadas a secretar collagenases e outras enzimas proteolíticas que corrompem a matriz extracelular (BOHL et al., 2014; FELDING-HABERMANN et al., 2001; GUO; GIANCOTTI, 2004; SEGUIN et al., 2015).

Apesar do predomínio dos tumores metastáticos em pacientes oncológicos, a metástase é considerada um processo surpreendentemente ineficaz (MASSAGUÉ; OBENAUF, 2016; WEISS, 1990). Para estabelecer-se com êxito em um sítio

secundário, uma célula tumoral deve completar todos os passos da cascata. O não cumprimento de qualquer passo acarreta falha de colonização e proliferação no órgão distante (KITAMURA; QIAN; POLLARD, 2015; POSTE; FIDLER, 1980). Os tumores lançam diariamente, milhões de células na corrente sanguínea, mas muito poucas metástases clinicamente relevantes são formadas. Várias etapas do processo metastático contribuem para a ineficiência do mesmo, alguns estudos elucidam que existem alguns pontos chave (FIDLER, ISAIAH J, 1970). Por exemplo, a destruição de células intravasadas por forças hemodinâmicas e de cisalhamento. No entanto, evidências recentes sugerem que isso pode não ser sempre o caso e que as células lançadas no sangue prendem-se e extravasam dos leitos capilares com alta eficiência e permanecem dormentes no sítio secundário por longos períodos de tempo, às vezes por anos. Micrometástases podem ser formadas, mas a maior parte destas lesões pré-clínicas regredem, provavelmente devido a apoptose (DEL MONTE, 2009; HA; HUNTER, 2014; HUNTER; CRAWFORD; ALSARRAJ, 2008; KASIMIR-BAUER, 2009; WANG, K. et al., 2009).

1.5 Angiogênese e Angiogênese Tumoral

A formação de novos vasos sanguíneos é um processo fisiológico que ocorre através de dois mecanismos distintos denominados: angiogênese e vasculogênese. No processo de vasculogênese, a formação dos vasos, é dada pela diferenciação de células precursoras endoteliais em células endoteliais maturadas. Apesar de este processo ocorrer apenas ao longo da fase embrionária, pesquisas atuais indicam que a vasculogênese também pode transcorrer no desenvolvimento de novos vasos sanguíneos e em neoplasias (ARBAB, 2012; EL HALLANI et al., 2010; FOLKINS et al., 2009; HAJRASOULIHA et al., 2012; PATENAUME; PARKER; KARSAN, 2010). Em contrapartida, a angiogênese ocorre durante o desenvolvimento embrionário e em adultos sob condições fisiológicas como na gestação, ciclo menstrual e reparos teciduais, caracteriza-se pelo desenvolvimento de novos vasos sanguíneos pela proliferação e migração de células endoteliais, processo essencial na carcinogênese (CLAPP et al., 2009; NIKITENKO, 2009; UCUZIAN et al., 2010).

A gênese dos vasos sanguíneos é constituída por dois diferentes tipos celulares; as células endoteliais que são responsáveis pelo revestimento dos vasos, e as células de suporte perivascular, também chamadas pericitos, células que formam uma camada única muscular lisa ao redor das células endoteliais, assegurando o suporte e estabilidade à parede desses vasos, ajustando a atividade vascular (GERHARDT; BETSHOLTZ, 2003; RUAN; SONG; OUYANG, 2009).

A célula tumoral necessita continuamente de nutrientes e oxigênio para sobreviver. O tumor progride até que, em dado instante, o volume de oxigênio é insuficiente para sua expansão e nutrição. A angiogênese tumoral é um aspecto primordial na carcinogênese e também no avanço do tumor, suprindo o mesmo com oxigênio e nutrientes necessários para sua progressão e proliferação. Este processo utiliza de maneira mais intensa e acelerada os mesmos mecanismos da angiogênese dos processos inflamatórios e de cicatrização. Para que haja o aumento do aporte de nutrientes e oxigênio, são expressos sinais extracelulares para geração de novos vasos sanguíneos com a finalidade de irrigar, nutrir e dar continuidade ao crescimento neoplásico (GAVALAS et al., 2013; PINHO, 2005; SHIBUYA, 2011; TAKAHASHI; SHIBUYA, 2005).

O estabelecimento do processo de vascularização acontece durante a formação e modificação vascular em uma sequência controlada de eventos que começam a partir de microvasos tumorais pré-existentes e, antes de suas demandas metabólicas serem reduzidas devido ao limite de difusão local (CARMELIET; JAIN, 2011). A escassez de oxigênio tanto promove quanto inibe a apoptose, e conduz a reações biológicas impulsionando o crescimento tumoral (SADRI; ZHANG, 2013). Deste modo as células neoplásicas asseguram a progressão tumoral, modificando seu fenótipo em prol da efetivação de alterações funcionais, que estimulam a síntese de fatores angiogênicos que se conectam a receptores próprios nas células endoteliais (LEE et al., 2007; YU; MOHAN; NATARAJAN, 2012).

As etapas da angiogênese tumoral acontecem da seguinte forma: ativação das células endoteliais por fatores pro-angiogênicos sintetizados e secretados pelas células tumorais. Em seguida, degradação da membrana basal e matriz extracelular pelas enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases de Matriz (MMPs), sintetizadas e secretadas pelas células endoteliais e tumorais. Desta forma as células endoteliais migram e proliferam a fim de constituir um novo vaso sanguíneo. Enfim, acontece a ligação das células chamadas *tips cells* às células endoteliais dos

novos capilares, gerando um novo lúmen e uma nova membrana basal (GRIZZI et al., 2005; WEIS; CHERESH, 2011).

Reagindo à diminuição do oxigênio livre, as células tumorais expressam o HIF-1 Fator Indutor de Hipóxia (cuja ação é promover a angiogênese), que migra do citoplasma para o núcleo celular (SEMENZA, 2013). Esta molécula é composta por duas subunidades, HIF- α e HIF-1 β encontradas em células tumorais somente na privação do oxigênio (BOS et al., 2003; RUNDQVIST; JOHNSON, 2013). Em condições normais de demanda de oxigênio, a proteína supressora tumoral *Von Hippel-Lindau* (pVHL) identifica e degrada o HIF α . Entretanto, em condições de hipóxia, o pVHL conecta-se ao óxido nítrico (NO) e não identifica o HIF-1 α , levando-o a ativação e consequente indução de expressão de genes responsivos à hipóxia como o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e bFGF (Fator de Crescimento de Fibroblasto Básico) (MIMEAULT; BATRA, 2013; SEMENZA, 2002; TUNG et al., 2013).

O VEGF é um fator de crescimento pertencente à superfamília (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas) PDGF-VEGF. Considerado fundamental na angiogênese tanto fisiológica quanto patológica atua diretamente através de receptores próprios expressos no endotélio vascular. Sua ativação desencadeia diferentes vias de sinalização intracelular resultando na sobrevivência, proliferação, divisão, migração e diferenciação celular endotelial, bem como ocasiona o aumento da permeabilidade vascular. Esse evento permite que proteínas plasmáticas extravasem para o espaço extravascular, levando ao crescimento de novos vasos sanguíneos. Isso faz com que o VEGF seja considerado um importante mediador de angiogênese (CAPP et al., 2009; GONÇALVES, 2015; VALIATTI et al., 2011).

O bFGF é um potente peptídeo angiogênico, que apresenta uma importante atividade mitogênica e quimiotáctica em células endoteliais e pode ser sintetizado e secretado por células tumorais. Apresenta uma alta ação oncogênica, atua no processo de transformação de fibroblastos normais em neoplásicos e possui uma elevada capacidade de estimular a angiogênese (PINHO, 2005). Sua ativação acontece quando o fator é liberado da matriz extracelular e liga-se com a heparina ou o heparan sulfato. Além de estimular o crescimento, o bFGF degrada a membrana basal através da ativação de collagenases e proteases. Essa ação sobre a matriz é de grande importância na invasão das células tumorais ao tecido subjacente (CAPP et al., 2009; ROMAGNOLI, 2007).

Diferentes estudos descrevem que os tumores possuem uma vascularização excepcionalmente ressaltante em relação aos tecidos normais. Estas descrições foram consideradas como um resultado do processo infeccioso derivado dos focos de necrose existentes na massa tumoral, a existência desta vascularização intensificada é um requisito primordial para processar-se o desenvolvimento neoplásico. Os microvasos que permeiam a área tumoral desenvolvem-se a partir de células endoteliais vinculadas aos capilares situados próximos às células neoplásicas (CICATIELLO et al., 2015; FOLKMAN, 1971; VASUDEV; REYNOLDS, 2014; WELTI et al., 2013).

2 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é definido como um grupo de tumores malignos com características de invasão aos tecidos circunvizinhos e possui uma alta capacidade metastática à distância (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003). A neoplasia de mama não é uma doença única, classificada como um conjunto de doenças distintas, (SIZIOPIKOU, 2013) com diferentes características histopatológicas e moleculares apresenta-se de maneiras clínicas diversas e com múltiplas variações de respostas a terapia (SORLIE, 2004).

No ano de 2001, foi proposta uma nova classificação para os carcinomas mamários, esta foi agregada à rotina de pacientes, médicos, oncologistas, radiologistas e patologistas, bem com a classificação molecular. Os carcinomas mamários abrangem mais de 20 subtipos morfológicos. De acordo com Perou et al. 2000 os tumores de mama possuem uma grande diversidade molecular e são subtipados em cinco grupos: luminal A, luminal B, luminal híbrido Her-2 e basal-*like* ou triplo-negativo. Cada um desses subtipos constitui um grupo de neoplasias com semelhanças no que compete aos genes alterados e que, definem as características imunohistoquímicas, prognósticas e terapias distintas. O tipo de câncer de mama recebe uma nomenclatura de acordo com suas características, os tipos de tecidos de onde foram gerados e, em alguns casos são identificados pela fase de desenvolvimento embrionário celular onde o tumor se originou (KAO et al., 2011; PEROU et al., 2000; TOMAO et al., 2015).

Os tumores classificados como luminais recebem essa designação devido à semelhança que as células tumorais têm com as células luminais que compõem os ductos das glândulas mamárias (CIRQUEIRA et al., 2011; STIVAL; PRESTES; MANSANI, 2014).

O subtipo luminal A, caracteriza-se por uma alta expressão genética nas células epiteliais luminais de citoqueratinas CK7, CK8, CK18 e CK19 (citoqueratinas são proteínas presentes no citoesqueleto somente das células epiteliais, o seu reconhecimento por meios imunocitoquímicos na biopsia de neoplasias permite o diagnóstico da sua origem epitelial). Geralmente possui baixo grau histológico e expressa receptores hormonais para estrogênio (RE⁺) e/ou progesterona (RP⁺) e índices de proliferação celulares denominados (KI67) baixos, menores que 10% (o KI67 é uma proteína nuclear, expressa em todas as partes ativas do ciclo celular, mas está ausente nas células em repouso) e negativo para Her-2 (Her-2 é a abreviatura de "Human Epidermal growth factor Receptor-type 2"), é um receptor tipo 2 do fator de crescimento epidermal humano. Em quantidades normais, esta proteína tem um papel importante no crescimento e desenvolvimento de células epiteliais. Este subtipo associa-se a um melhor prognóstico e é bastante responsável à terapia anti-hormonal (BITENCOURT et al., 2014; SORLIE et al., 2001).

O subtipo luminal B, caracteriza-se por uma baixa ou moderada expressão genética nas células epiteliais luminais de citoqueratinas CK7, CK8, CK18 e CK19, evidencia um grau histológico mais alto, pode apresentar receptores hormonais para (RE⁺) e/ou (RP⁺) em associação ou não ao Her-2, e também apresentam KI67 (taxa de divisão celular) mais elevado, maior que 15%. Dado esse que favorece o uso de quimioterapia e hormonioterapia como tratamentos neo ou adjuvantes ao tratamento cirúrgico. Ele também está associado a um pior prognóstico, relacionado à recidiva tumoral, por apresentar possíveis similaridades com os tumores RE negativos (subtipos superexpressão do Her-2 e basal) (CIRQUEIRA et al., 2011; SORLIE, 2004; SORLIE et al., 2001; SORLIE et al., 2003).

O Her-2 e o Basal-*like*, juntos respondem por 15% dos outros tipos de câncer de mama cada um. Ambos têm como importante característica a não expressão de RE⁺ e RP⁺. O subtipo Her-2 caracteriza-se por aumentada expressão da oncoproteína Her-2, que é fortemente relacionado a um perfil metastático e uma maior agressividade tumoral, porém não apresenta receptores hormonais RE e RP.

A amplificação do oncogene Her-2 e, conjuntamente, a superexpressão de sua proteína, implica em um importante biomarcador de prognóstico no carcinoma de mama. Esse subtipo possui o segundo pior prognóstico em relação aos outros, no entanto apresenta resposta positiva a terapia alvo baseadas no bloqueio da atividade da oncoproteína, como, por exemplo, o anticorpo monoclonal trastuzumab (SCHMITT, F. C. L., 2008; SORLIE et al., 2001; STIVAL et al., 2014).

O subtipo basal-*like* ou triplo negativo demonstra em sua morfologia um grau muito mais alto tanto histológico quanto nuclear, é possível distinguir dentro do tumor infiltrado inflamatório e com muita frequência a presença de áreas em necrose. É caracterizado pela expressão de vários genes de células basais/mioepiteliais e um acentuado índice da taxa de proliferação celular (KI67). É um subtipo negativo para receptores hormonais RE⁻ e RP⁻, e negativo também para a proteína do oncogene Her-2. Segundo as mais recentes publicações, esse subtipo apresenta positividade para o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), citoqueratinas basais: CK5, CK6, CK14, CK17, P-caderina e p53 (ALI et al., 2016; RAKHA et al., 2007; REIS-FILHO; TUTT, 2008). Também está relacionado a mutações no gene BRCA1. Em virtude desse perfil, não apresenta alvo terapêutico estabelecido não respondendo ao tratamento com drogas anti-hormonais nem com o anticorpo monoclonal. Estes fatores associam o subtipo basal-*like* ao pior prognóstico (HOSNY et al., 2016; JAMES et al., 2007; TURNER et al., 2007).

2.1 Prevenção, principais tratamentos e diagnóstico do câncer de mama

É impraticável a prevenção primária da neoplasia mamária em razão de variações envolvidas na sua etiologia tais como, os fatores de risco e o caráter genético da doença. A prevenção secundária, priorizando a detecção precoce e enfatizando mudanças nos fatores associados ao modo de vida, em todas as idades, e com intervenções de combate a agentes ambientais e ocupacionais cancerígenos, pode trazer bons resultados na redução do câncer (BURNS et al., 2016; D'ORSI et al., 2005; ELMORE, J. G. et al., 2005).

As estratégias de prevenção secundária buscam o rastreamento da doença, para se evitar assim a progressão tumoral para estágios mais avançados e elevar a perspectiva de cura. Para se detectar precocemente o tumor, recomendam-se três

práticas preventivas: o autoexame das mamas realizado mensalmente, para mulheres de todas as idades; exame clínico executado anualmente por profissional de saúde e a mamografia anual recomendada para mulheres acima de 40 anos (AMORIM et al., 2008; DAVIM et al., 2003). Após a confirmação diagnóstica da doença, dá-se início ao tratamento, baseando-se nas características patológicas do tumor, como tipos histológicos e subtipos moleculares, definindo então a modalidade terapêutica adequada (BARROS et al., 2001; CANTLEY, 2016).

O tratamento para os diferentes tipos de câncer é um dos maiores desafios médicos da atualidade com avanços nas últimas décadas. Os protocolos iniciam com quimioterapia neo-adjuvante, seguida pela remoção cirúrgica do tumor ou a mastectomia em alguns casos. Subsequentemente, quimioterapia adjuvante e posterior ou concomitantemente a radioterapia. Dependendo da classificação e do subtipo molecular do tumor, algumas pacientes ainda realizam a hormonoterapia por longos períodos, entre 5 a 10 anos de pós-tratamento (SLEDGE et al., 2014; VILA et al., 2016).

Os pacientes diagnosticados com carcinoma *in situ* ou no estágio inicial da doença podem beneficiar-se de tratamento com finalidade potencialmente curativa, sendo este multidisciplinar, envolvendo associação de tratamento local: cirurgia e / ou radioterapia e tratamento sistêmico: quimioterapia, terapia-alvo e hormônio terapia (CHENG; UENO, 2012).

Apesar do abalo emocional gerado com consequentes impactos na autoestima feminina, a intervenção cirúrgica é a opção primária para a neoplasia mamária e tem por finalidade a remoção macroscópica do tumor. A cirurgia também pode abranger locais próximos ao tumor, como tecidos adjacentes, linfonodos axilares ou até mesmo a remoção completa da mama. Além disso, existe a: mastectomia radical modificada, onde se tem a retirada de toda a mama juntamente com os linfonodos axilares (SILVA, 2008; WANG, L. et al., 2016).

O tratamento radioterápico é frequentemente empregado em conjunto com a cirurgia, ou posteriormente, tido como um complemento fundamental para o êxito do tratamento. A radioterapia é indicada para tumores localizados que não podem ser totalmente removidos ou em casos que estes tendem a reincidir ao local após a intervenção cirúrgica. As radiações em contato com os tecidos provocam lesões de várias formas, causando o rompimento das estruturas celulares, produzindo modificações químicas e biológicas. Essas modificações acabam por causar danos

ao DNA e consecutivamente levar a célula a apoptose, porém a célula tumoral evade aos sinais apoptóticos (BROMBERG; HANRIOT; NAZÁRIO, 2013). Assim, os tumores reincidentes de uma área previamente irradiada geram uma maior possibilidade de metástase. Pesquisas e evidências clínicas atestam que as recidivas ocorridas após a radioterapia estão relacionadas com a amplificação do potencial metastático, e tendência tumoral mais invasiva. Essa condição é denominada efeito leito tumoral, são mudanças induzidas pela radiação do microambiente tumoral, contribuindo para um perfil tumoral muito mais agressivo, porém os recursos moleculares implícitos são ainda imperceptíveis (ASPARUHOVA et al., 2015).

A quimioterapia constitui-se de agentes anti-proliferativos sistêmicos que destroem preferencialmente células em divisão objetivando a erradicação do tumor. Contudo, esses fármacos não são seletivos para células tumorais e sua eficácia terapêutica fica limitada devido ao dano que podem causar às células e tecidos normais. A ação da maioria dos agentes quimioterápicos prevalece sobre as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico (DE WEVER et al., 2008; MARSH; LIU, 2009; MONSANTO et al., 2013).

Devido a essa inespecificidade quanto ao alvo, os agentes antineoplásicos provocam vários efeitos adversos, que são divididos em dois grupos: agudos, iniciando consecutivamente após a dose administrada, persistindo por alguns dias; e tardios, que podem aparecer semanas ou até mesmo meses após a infusão dos medicamentos (ROQUE; FORONES, 2006). Estes efeitos adversos podem também ser classificados como toxicidade hematológica e não hematológica. O grupo de toxicidade hematológica abrange as células da medula óssea, que também são altamente susceptíveis aos efeitos citotóxicos levando a trombocitopenia, leucopenia e a neutropenia febril. Entre os efeitos adversos que são relatados no grupo de toxicidade não hematológica destacam-se complicações cardíacas, gastrintestinais, hepáticas, renais, neurológicas, pulmonares, dermatológicas, alterações metabólicas, disfunções reprodutivas e reações alérgicas (GUIMARÃES, 2012).

Os subtipos moleculares que possuem receptores de estrogênio RE⁺ representam aproximadamente dois terços das neoplasias mamárias responsivas a manipulações do sistema endócrino e, portanto o uso da terapia anti-hormonal mostra resultados satisfatórios. O estrogênio ligado ao receptor alfa ou beta na

superfície celular, é capaz de conduzir uma gama de ações celulares e condições fisiológicas, tais como a proliferação das células neoplásicas. A terapia anti-hormonal age bloqueando receptores específicos, inibindo ou impedindo o crescimento tumoral. Os promotores anti-hormonais aprovados para o tratamento ou prevenção do câncer de mama são os moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERMs) e os inibidores da aromatase (AIs). Dentre os SERMs estão o tamoxifeno e raloxifeno, enquanto que os AIs são o anastrozol, letrozol e exemestano. Ambas as categorias de fármacos dominam diferentes vias metabólicas de ativação e eliminação convergindo para a uma via final comum entre os SERMs e AIs que é o desequilíbrio da sinalização estrogênica nas células tumorais. Desta maneira segundo a variedade genética, proteínas distintas podem estar envolvidas no metabolismo promovendo diferenciados resultados nos pacientes. Além disso, elementos genéticos podem ocasionar assimilação ou entrega do fármaco diferente, cooperando para diversidades na eficácia medicamentosa (WESTBROOK; STEARNS, 2013).

Ação específica nas células tumorais evitando danos às células normais é o mecanismo da terapia alvo. Anticorpos monoclonais altamente capazes de restringir o avanço tumoral é a ferramenta empregada nesta terapia. Os anticorpos predominantes desta modalidade de tratamento são trastuzumabe e bevacizumabe. O trastuzumab é um anticorpo monoclonal humanizado que se liga de maneira específica ao receptor Her-2, suspendendo a multiplicação celular nos subtipos moleculares que superexpressam a proteína do oncogene Her-2. A quimioterapia combinada com trastuzumab conduz a diminuição expressiva na reincidência e letalidade da neoplasia Her-2⁺, quando utilizado no contexto de adjuvante (PICCART-GEBHART et al., 2005; ROMOND et al., 2005; SLAMON et al., 2011). Da mesma forma de ação, o bevacizumab também é um anticorpo monoclonal humanizado direcionado especificamente ao Fator de Crescimento Endotelial Vascular A (VEGF-A), importante promotor da angiogênese, fator fundamental para a proliferação do tumor (WESTBROOK; STEARNS, 2013).

A indução de apoptose tem sido um dos importantes mecanismos de ação dos agentes anti-tumorais e recentes estudos tem focado no uso de enzimas topoisomerase de DNA, que são essenciais para a replicação do DNA e consequentemente para a sobrevivência da célula (CHAN; COWARD, 2013). Muitas proteínas isoladas de peçonhas de serpentes capazes de induzir apoptose em

células tumorais vêm sendo amplamente estudadas para o desenvolvimento de tratamento alternativo para as neoplasias (AZEVEDO et al., 2016; CORREA et al., 2002; MONTENEGRO et al., 2012; NOLTE et al., 2012; VYAS et al., 2013).

Atualmente vários estudos têm demonstrado que proteínas ou peptídeos de peçonha de serpentes podem também ligar-se especificamente a membranas de células cancerígenas, afetando a migração e a proliferação celular (VYAS et al., 2013). A crotoxina, uma fosfolipase A₂ isolada da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, apresenta citotoxicidade para células tumorais em estudos “*in vitro*” e “*in vivo*” e está sendo testada em estudos farmacocinéticos e de fase I em pacientes com câncer avançado (CURA et al., 2002). Também foram relatados por Stanchi e colaboradores 2002, estudos de um composto denominado VRCTC-310-ONCO desenvolvido a partir da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* que possui potenciais efeitos antineoplásicos (STANCHI et al., 2002).

Outro estudo “*in vitro*” conduzido por (AZEVEDO et al., 2016) demonstra o efeito antitumoral de uma fosfolipase A2 isolada de *Bothrops pauloensis* denominada BnSP-6, levando ao efeito antitumoral em células MDA-MB-231 (câncer de mama triplo negativo). Foram observados ação sobre apoptose e autofagia, além de demonstrar a expressão de genes por PCR em tempo real, relacionados a essas vias. Interessantemente observou-se ação sobre citotoxicidade, inibição da adesão e migração de células tumorais.

Dentre as muitas toxinas estudadas para o combate do desenvolvimento e proliferação do câncer encontram-se as metaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMPs – *Snake Venom Metalloproteinases*), lectina tipo-C e desintegrinas que inibem a migração celular *in vitro* e a progressão do tumor *in vivo*, por interagirem especificamente com algumas integrinas nas membranas celulares (KAMIGUTI; ZUZEL; THEAKSTON, 1998; MARKLAND, 1998; MONTENEGRO et al., 2012; VYAS et al., 2013). As SVMPs merecem um lugar de destaque por possuírem várias características prejudiciais e tóxicas ao ambiente celular. Estas toxinas têm sido alvo de investigações científicas, podendo ser usadas como ferramentas úteis no estudo de vários processos biológicos, tais como: migração e adesão celular, indução de apoptose, agregação plaquetária e angiogênese. Mecanismos estes utilizados por células tumorais no estabelecimento e propagação de diferentes tipos de câncer (COMINETTI et al., 2004). Nesse contexto, as SVMPs representam um

potencial e promissor alvo para pesquisas que gerem conhecimentos a cerca de novos candidatos à bioprospecção de medicamentos para a terapia do câncer.

3 METALOPROTEASES DE PEÇONHA DE SERPENTES (SVMPs)

As SVMPs são enzimas pertencentes ao clan “Metzincin” descrita por Stocker e colaboradores 1995, em virtude de serem metaloproteases dependentes de zinco e terem uma metionina em comum na volta abaixo do sítio ativo e um segmento em hélice carboxi-terminal, contendo dois ou três resíduos de histidina envolvidos no sítio de ligação do zinco. A volta de metionina forma uma base hidrofóbica sob o centro ativo da hélice e da cavidade de ligação do substrato. O sítio ligante de zinco possui uma sequência de aminoácidos comum nos diferentes membros desta família de metaloproteases, HEBXHXBGBXH, onde H é uma histidina, E é o ácido glutâmico, G é a glicina, B é qualquer resíduo hidrofóbico, X é qualquer aminoácido. (GOMIS-RUTH, 2009; MOURA-DA-SILVA; BALDO, 2012; STOCKER; BODE, 1995; STOCKER et al., 1995).

As metaloproteases são estocadas na glândula de veneno como zimogênios e são ativadas geralmente por hidrólise de um pró-domínio através de um mecanismo cisteína *switch-like* semelhante ao descrito para as metaloproteases da matriz extracelular. Neste mecanismo o grupo tiol de um resíduo de cisteína presente numa sequência altamente conservada (PKM**C**GVT), adjacente ao domínio protease, está ligado ao íon zinco do sítio ativo, dessa forma bloqueando a função enzimática (GRAMS et al., 1993). No processamento proteolítico dessas metaloproteases, o qual também pode ser autolítico, o grupo tiol é liberado do sítio ativo e a enzima é ativada. Vários ativadores potenciais de pro-metaloproteases de peçonhas de serpentes foram descritos, tais como agentes oxidantes, surfactantes, metais pesados, entre outros, que modificam o resíduo de cisteína e dessa forma promovem a desestabilização da ligação do zinco com o grupo tiol da cisteína ativando a enzima (NAVES DE SOUZA et al., 2012; SHIMOKAWA et al., 1996).

As SVMPs são proteínas multimodulares apresentando massas moleculares variando de 20 a 110 kDa. De acordo com a constituição de seus domínios estruturais, as SVMPs são classificadas em três classes, designadas PI, PII, PIII e onze subclasses (PIa, PIa, PIIb, PIIc, PIId, PIle, D-I, PIIla, PIIlb, PIIlc e PIIId), representadas na Figura 1 (FOX; SERRANO, 2008). Na sua forma madura, as metaloproteases da classe PI são compostas apenas pelo domínio metaloprotease ligante de zinco. As da classe P-II, possuem além do domínio metaloprotease um

domínio desintegrina no carboxi-terminal, possuindo a sequência XXCD, ao invés da seqüência Arg-Gly-Asp (RGD) presente nos peptídeos desintegrinas presentes nas peçonhas ofídicas. A classe P-III, contém um domínio rico em cisteína, além dos domínios metaloprotease e desintegrina-*like*, enquanto as metaloproteases da subclasse P-IIId possuem um domínio adicional lectina tipo-C *like*. O critério utilizado para classificar as SVMPs foi essencialmente baseado na presença ou ausência dos domínios não catalíticos que são observados por análises de transcriptoma ou por proteínas isoladas das peçonhas.

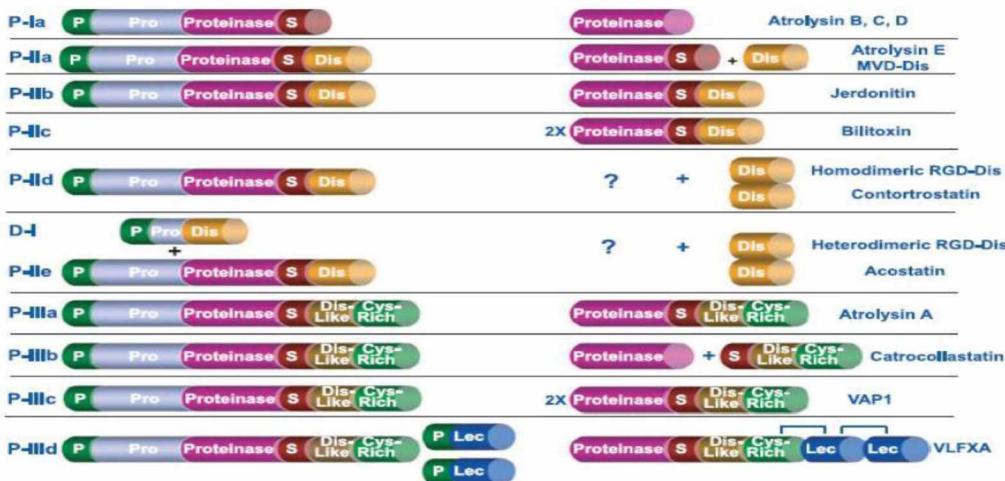


Figura 1: Classificação das SVMPs. Precursors multimodulares (à esquerda) e proteínas após processamento (à direita). **P:** peptídeo sinal; **Pro:** porção pró-domínio, removido durante sua ativação; **Proteinase:** domínio metaloproteinase sequência HEBXHXBGBXH, **S:** sequência de aminoácidos entre o domínio catalítico e disintegrina ou semelhante à disintegrina, **Dis:** disintegrina, **Dis-Like:** domínio semelhante à disintegrina, **Cys-Rich:** domínio rico em cisteína, **Lec:** domínio lectina tipo C. As lacunas com o símbolo interrogação (?) denotam que não foi constatado o precursor em peçonhas ofídicas. Retirado de (FOX; SERRANO, 2008).

A diversidade de domínios estruturais das SVMPs confere às mesmas várias atividades biológicas, tais como alterações na hemostasia, hemorragia, edema, necrose e inflamação que caracterizam o quadro fisiopatológico do envenenamento (ESCALANTE et al., 2011; GUTIERREZ; ESCALANTE; RUCAVADO, 2009; GUTIERREZ; RUCAVADO, 2000; GUTIERREZ et al., 2005; LAING et al., 2003; MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000; RODRIGUES, V. M. et al., 2015).

As SVMPs têm sido bastante utilizadas em estudos *in vitro*, demonstrando que estas causam proteólise dos componentes da matriz extracelular (colágeno tipo IV, laminina, fibronectina), proteínas do plasma (fibrinogênio, fibrina, fator de Von

Willenbrand, protrombina) e proteínas da superfície celular (integrinas e caderinas). Além disso, SVMPs são capazes de interagir com receptores das plaquetas, de células endoteliais e fibroblastos, ativando ou inibindo a resposta celular (MOURA-DA-SILVA; BUTERA; TANJONI, 2007; WHITE, 2005). Esses efeitos podem resultar em várias alterações fisiopatológicas tais como inflamação, inibição da agregação plaquetária, apoptose e principalmente hemorragia (GUTIERREZ et al., 2005), uma das principais complicações do envenenamento ofídico.

Estudos que comprovam a ação proteolítica das SVMPs hemorrágicas sobre proteínas da matriz extracelular atestam o poder de hidrólise de substratos variados, porém com diferentes especificidades (BARAMOVA et al., 1989). Essa ação proteolítica promove uma fragilidade e perda da integridade dos capilares resultando em hemorragia (BALDO et al., 2010). Esses estudos denotam que as SVMPs da classe PIII são as mais potentes hemorraginas contidas nas peçonhas ofídicas devido ao fato de apresentarem em sua estrutura o domínio metaloprotease com forte ação proteolítica somando-se aos domínios semelhante à desintegrina (XCD) e rico em cisteína que, juntos conferem o poder de ligação aos componentes da membrana basal, tais como o colágeno tipo IV, o que leva a alta concentração de toxinas nos capilares intensificando os danos provocados à microvasculatura (ESCALANTE et al., 2011).

Metaloproteases de classe PIII não possuem a sequência RGD correspondente ao domínio desintegrina, entretanto apresentam um domínio com a sequência XCD intitulado tipo disintegrina (desintegrina like), que também interfere na função plaquetária (PAINÉ et al., 1992). A sequência XCD é quem confere as SVMPs da classe PIII a capacidade de interferência na hemostasia e função das plaquetas, permitindo a interação com as integrinas plaquetárias $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_2\beta_3$ impossibilitando assim a ligação com o colágeno e o fibrinogênio. Uma outra maneira de ação sobre o complexo de plaquetas é a proteólise do fator de Von Willebrand e das integrinas (MOURA-DA-SILVA; BALDO, 2012; SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011; WIJEWICKREMA; BERNDT; ANDREWS, 2005). É considerável ressaltar que outras sequências tripeptídicas semelhantes a RGD já foram encontradas e descritas em desintegrinas das peçonhas ofídicas; tais como MLD, KGD, ECD, VGD, entre outras e também possuem ação similar a RGD clássica sobre a agregação plaquetária (CALVETE et al., 2005).

Há um aumento na busca de diferentes estratégias aplicadas à pesquisa em peçonhas ofídicas com ação antitumoral, visando focar não só na identificação de toxinas com esta aplicabilidade, mas também na forma de elucidar o mecanismo de ação de toxinas que apresentem ações diretas contra o câncer (CALDERON et al., 2014). Jararagina, uma SVMP-PIII isolada a peçonha de *B. jararaca* (PAINE et al., 1992) induziu citotoxicidade, inibição da adesão, migração e invasão celular ‘in vitro’ em células SKMEL-28 de melanoma humano (CORREA et al., 2002). Além disso, essa toxina interfere na capacidade de formação de metástases “in vivo” (MARIA et al., 2014) e induziu a expressão de IL-8, moléculas de adesão e óxido nítrico em células endoteliais (LOPES et al., 2012).

Outras SVMP-PIII com potencial antitumoral são destaques na literatura, a saber: a TSV-DM P-III-B isolada da peçonha de *Trimeresurus stejnegeri* que, inibiu a proliferação celular e induziu alterações morfológicas em células endoteliais ECV304 (CHAISAKUL et al., 2016; WAN et al., 2006). ACTX-6 isolada da peçonha de *Agkistrodon acutus*, que induziu apoptose em linhagens de células tumorais HeLa (ZHANG; WEI, 2007). Acocostatin, um peptídeo desintegrina-like recombinante clonado do mRNA da glândula de veneno da *Agkistrodon contortrix contortrix*, foi capaz de induzir apoptose em células endoteliais da Veia Umbilical Humana HUVECs e em células HeLa, e também agiu impedindo a migração de células SK-MEL-28. (TEKLEMARIAM et al., 2011). Peptídeos sintéticos contendo a sequência RGD, a qual está presente em peptídeos desintegrinas isolados de peçonha de serpente, estão sendo utilizados no tratamento de pacientes com câncer. Cilengitide é um peptídeo antagonista de integrina α_v que está sendo avaliado em estudos de fase II em pacientes com glioblastoma (MACDONALD et al., 2013).

Os estudos supracitados inferem que as SVMPs possuem uma extensa série de atividades e uma considerável participação nos efeitos fisiopatológicos ligados ao envenenamento por peçonhas ofídicas, bem como em várias ações terapêuticas. Desta forma, esses resultados conduzem a uma provável aplicação das peçonhas de serpente, bem como suas toxinas isoladas para o tratamento do câncer (BORKOW; CHAIM-MATYAS; OVADIA, 1992; CALDERON et al., 2014; CHAISAKUL et al., 2016; MARIA et al., 2014).

A peçonha de *Bothrops pauloensis* possui cerca de 30% do seu conteúdo proteico representado por metaloproteases (RODRIGUES, R. S. et al., 2012). Dessa peçonha já foram isoladas três metaloproteases, sendo duas da classe PI,

denominadas de BpMP-I (NAVES DE SOUZA et al., 2012) e BpMP-II (ACHE et al., 2015) e uma da classe PIII denominada Bothropoidina (GOMES et al., 2015).

Bothropoidina é uma metaloprotease hemorrágica de Classe PIII isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis* por Gomes e colaboradores 2015. Esta proteína apresenta massa molecular de aproximadamente 49kDa e é capaz de hidrolisar diferentes substratos como azocaseína, fibrinogênio, fibrina, colágeno e fibronectina. Esta enzima interfere na coagulação sanguínea alterando os tempos de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e de protrombina (TP), causando incoagulabilidade sanguínea. Esta enzima também é capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno e ADP e interferir em processos de adesão celular demonstrando seu potencial terapêutico (GOMES et al., 2015).

Os estudos de caracterização funcional demonstraram também que essa molécula foi capaz de induzir danos ao tecido muscular levando as células a desenvolver alterações morfológicas como necrose das fibras, edema e presença de infiltrado inflamatório, alterações estas observadas em músculo gastrocnêmio de camundongos tratados com a toxina. Outro efeito demonstrado pela Bothropoidina foi a interferência na adesão e viabilidade celular. Efeitos estes que acreditam ser devido à interação do domínio não catalítico da enzima com integrinas de membrana (GOMES et al., 2015).

Bothropoidina ainda não havia sido submetida a estudos que caracterizassem o seu potencial efeito antitumoral e antiangiogênico. Assim, neste trabalho foi avaliada a capacidade da toxina em eventos fisiopatológicos dessa natureza bem como a sua atuação na indução a apoptose em células tumorais. A seguir serão apresentados resultados da avaliação realizada da ação antitumoral e antiangiogênica de Bothropoidina sobre células tumorais de câncer de mama MDA-MB-231 e células endoteliais murinas denominadas t-End. Entende-se que a caracterização do efeito antitumoral e antiangiogênico dessa toxina abrirá novas perspectivas para estudos de sinalização de vias de morte celular, bem como de experimentos “in vivo” visando o uso dessa toxina como ferramenta para o desenvolvimento de tratamentos alternativos para o câncer.

OBJETIVOS

4 Objetivos

4.1 Objetivo Geral

Caracterizar o efeito antitumoral e antiangiogênico da *Bothropoidina*, uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* sobre células tumorais e endoteliais humanas.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a ação da toxina na viabilidade celular.
- Avaliação da apoptose por Anexina V e Iodeto de Propídeo .
- Inibição da migração celular por Wound Healing.
- Avaliar a ação da *Bothropoidina* na inibição da angiogênese pela formação de túbulos em matrigel.

REFERÊNCIAS

- ACHE, D. C. et al. Biochemical properties of a new PI SVMP from Bothrops pauloensis: inhibition of cell adhesion and angiogenesis. **Int J Biol Macromol**, v. 72, p. 445-53, Jan 2015.
- ALI, A. M. et al. Triple Negative Breast Cancer: A Tale of Two Decades. **Anticancer Agents Med Chem**, Jul 25 2016.
- ALMEIDA, V. L. D. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.
- AMORIM, V. M. S. L. et al. Fatores associados a não realização da mamografia e do exame clínico das mamas: um estudo de base populacional em Campinas, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, p. 2623-2632, 2008.
- APLIN, A. E.; HOWE, A. K.; JULIANO, R. L. Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. **Curr Opin Cell Biol**, v. 11, n. 6, p. 737-44, Dec 1999.
- ARBAB, A. S. Activation of alternative pathways of angiogenesis and involvement of stem cells following anti-angiogenesis treatment in glioma. **Histol Histopathol**, v. 27, n. 5, p. 549-57, May 2012.
- ARRUDA MACEDO, J. K.; FOX, J. W.; DE SOUZA CASTRO, M. Disintegrins from snake venoms and their applications in cancer research and therapy. **Curr Protein Pept Sci**, v. 16, n. 6, p. 532-48, 2015.

ASPARUHOVA, M. B. et al. Mechanism of irradiation-induced mammary cancer metastasis: A role for SAP-dependent Mkl1 signaling. **Mol Oncol**, v. 9, n. 8, p. 1510-27, Oct 2015.

AVRAAMIDES, C. J.; GARMY-SUSINI, B.; VARNER, J. A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 8, p. 604-17, Aug 2008.

AZEVEDO, F. V. et al. Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA(2) homologue from Bothrops pauloensis venom. **Int J Biol Macromol**, v. 82, p. 671-7, Jan 2016.

BALDO, C. et al. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 6, p. e727, 2010.

BARAMOVA, E. N. et al. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. **Arch Biochem Biophys**, v. 275, n. 1, p. 63-71, Nov 15 1989.

BARRETT, J. C. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. **Environ Health Perspect**, v. 100, p. 9-20, Apr 1993.

BARROS, A. et al. Diagnóstico e tratamento do câncer de mama. **AMB/CFM-Projeto Diretrizes**, p. 1-15, 2001.

BISSELL, M. J.; HINES, W. C. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. **Nat Med**, v. 17, n. 3, p. 320-9, Mar 2011.

BITENCOURT, A. G. V. et al. Correlation between PET/CT results and histological and immunohistochemical findings in breast carcinomas. **Radiologia brasileira**, v. 47, n. 2, p. 67-73, 2014.

BOHL, C. R. et al. Metastasis suppressors in breast cancers: mechanistic insights and clinical potential. **J Mol Med (Berl)**, v. 92, n. 1, p. 13-30, Jan 2014.

BORKOW, G.; CHAIM-MATYAS, A.; OVADIA, M. Binding of cytotoxin P4 from Naja nigricollis nigricollis to B16F10 melanoma and WEHI-3B leukemia cells. **FEMS Microbiol Immunol**, v. 5, n. 1-3, p. 139-45, Sep 1992.

BORNER, M. M. et al. Expression of apoptosis regulatory proteins of the Bcl-2 family and p53 in primary resected non-small-cell lung cancer. **Br J Cancer**, v. 79, n. 5-6, p. 952-8, Feb 1999.

BOS, R. et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1 α independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. **Cancer**, v. 97, n. 6, p. 1573-1581, 2003.

BRASIL. **Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM**. (DATASUS)., D. D. I. D. S.: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205> p. 2015.

BROMBERG, S. E.; HANRIOT, R. D. M.; NAZÁRIO, A. C. P. Radioterapia intraoperatória como protocolo de tratamento do câncer de mama inicial. **Einstein (São Paulo)**, v. 11, p. 439-445, 2013.

BURNS, R. B. et al. Should We Offer Medication to Reduce Breast Cancer Risk?: Grand Rounds Discussion From Beth Israel Deaconess Medical Center. **Ann Intern Med**, v. 165, n. 3, p. 194-204, Aug 2 2016.

CALDERON, L. A. et al. Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

CALDON, C. E.; SUTHERLAND, R. L.; MUSGROVE, E. Cell cycle proteins in epithelial cell differentiation: implications for breast cancer. **Cell Cycle**, v. 9, n. 10, p. 1918-28, May 15 2010.

CALVETE, J. J. et al. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1063-74, Jun 15 2005.

CANTLEY, L. C. Seeking out the sweet spot in cancer therapeutics: an interview with Lewis Cantley. **Disease Models and Mechanisms**, 2016-08-04 02:57:04 2016.

CAPP, C. et al. Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireóide. **Revista HCPA**, v. 29, n. 1, p. 51-59, 2009.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 298-307, May 19 2011.

CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 2, p. 118-32, Feb 2004.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1559-64, Mar 25 2011.

CHAIKUL, J. et al. Effects of Animal Venoms and Toxins on Hallmarks of Cancer. **J Cancer**, v. 7, n. 11, p. 1571-8, 2016.

CHAN, B. A.; COWARD, J. I. Chemotherapy advances in small-cell lung cancer. **J Thorac Dis**, v. 5 Suppl 5, p. S565-78, Oct 2013.

CHENG, Y. C.; UENO, N. T. Improvement of survival and prospect of cure in patients with metastatic breast cancer. **Breast Cancer**, v. 19, n. 3, p. 191-9, Jul 2012.

CHOI, W. S. et al. Correlation between structure of Bcl-2 and its inhibitory function of JNK and caspase activity in dopaminergic neuronal apoptosis. **J Neurochem**, v. 74, n. 4, p. 1621-6, Apr 2000.

CICATIELLO, V. et al. Powerful anti-tumor and anti-angiogenic activity of a new anti-vascular endothelial growth factor receptor 1 peptide in colorectal cancer models. **Oncotarget**, v. 6, n. 12, p. 10563, 2015.

CIRQUEIRA, M. B. et al. Subtipos moleculares do câncer de mama. **Femina**, v. 39, n. 10, 2011.

CLAPP, C. et al. Peptide hormone regulation of angiogenesis. **Physiol Rev**, v. 89, n. 4, p. 1177-215, Oct 2009.

COMINETTI, M. R. et al. Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. **J Biol Chem**, v. 279, n. 18, p. 18247-55, Apr 30 2004.

CORREA, M. C., JR. et al. Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 739-48, Jun 2002.

CURA, J. E. et al. Phase I and pharmacokinetics study of crotoxin (cytotoxic PLA(2), NSC-624244) in patients with advanced cancer. **Clin Cancer Res**, v. 8, n. 4, p. 1033-41, Apr 2002.

D'ORSI, C. et al. Current realities of delivering mammography services in the community: do challenges with staffing and scheduling exist? **Radiology**, v. 235, n. 2, p. 391-5, May 2005.

DAVIM, R. M. B. et al. Auto-exame de mama: conhecimento de usuárias atendidas no ambulatório de uma maternidade escola. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 11, p. 21-27, 2003.

DE EVER, O. et al. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. **Int J Cancer**, v. 123, n. 10, p. 2229-38, Nov 15 2008.

DEBERARDINIS, R. J. et al. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. **Cell Metab**, v. 7, n. 1, p. 11-20, Jan 2008.

DEL MONTE, U. Does the cell number 109 still really fit one gram of tumor tissue? **Cell Cycle**, v. 8, n. 3, p. 505-506, 2009.

DÓRIA, G. A. A. Avaliação da atividade antitumoral da Remirea maritima AUBL. 2015.

EL HALLANI, S. et al. A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. **Brain**, v. 133, n. Pt 4, p. 973-82, Apr 2010.

ELENBAAS, B. et al. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. **Genes Dev**, v. 15, n. 1, p. 50-65, Jan 1 2001.

ELMORE, J. G. et al. Screening for breast cancer. **Jama**, v. 293, n. 10, p. 1245-56, Mar 9 2005.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

ESCALANTE, T. et al. Role of collagens and perlecan in microvascular stability: exploring the mechanism of capillary vessel damage by snake venom metalloproteinases. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28017, 2011.

FELDING-HABERMANN, B. et al. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 4, p. 1853-8, Feb 13 2001.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, Mar 1 2015.

FERNANDES MORAIS, J. et al. BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE COMPOSTOS BIOATIVOS COM ATIVIDADE ANTITUMORAL. **UNINGÁ Review**, v. 17, n. 1, 2014.

FIDLER, I. J. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125I-5-iodo-2'-deoxyuridine. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 45, n. 4, p. 773-782, 1970.

FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 6, p. 453-8, Jun 2003.

FOLKINS, C. et al. Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1. **Cancer Res**, v. 69, n. 18, p. 7243-51, Sep 15 2009.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **New england journal of medicine**, v. 285, n. 21, p. 1182-1186, 1971.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **Febs j**, v. 275, n. 12, p. 3016-30, Jun 2008.

FRAME, F. M. et al. Mechanisms of growth inhibition of primary prostate epithelial cells following gamma irradiation or photodynamic therapy include senescence, necrosis, and autophagy, but not apoptosis. **Cancer Medicine**, v. 5, n. 1, p. 61, 2016.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 1, p. 107-20, Jan 2012.

GAVALAS, N. G. et al. Angiogenesis-related pathways in the pathogenesis of ovarian cancer. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 8, p. 15885-909, 2013.

GERHARDT, H.; BETSHOLTZ, C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. **Cell Tissue Res**, v. 314, n. 1, p. 15-23, Oct 2003.

GOMES, M. S. et al. Biochemical and functional characterization of Bothropoidin: the first haemorrhagic metalloproteinase from Bothrops pauloensis snake venom. **J Biochem**, v. 157, n. 3, p. 137-49, Mar 2015.

GOMIS-RUTH, F. X. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. **J Biol Chem**, v. 284, n. 23, p. 15353-7, Jun 5 2009.

GONÇALVES, L. M. C. Avaliação da expressão génica num modelo de neoplasia experimental da mama. 2015.

GRAMS, F. et al. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. **FEBS Lett**, v. 335, n. 1, p. 76-80, Nov 29 1993.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. D. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GRIZZI, F. et al. Quantitative evaluation and modeling of two-dimensional neovascular network complexity: the surface fractal dimension. **BMC cancer**, v. 5, n. 1, p. 1, 2005.

GUIMARÃES, A. G. C. Caracterização sociodemográfica e avaliação da qualidade de vida em mulheres com câncer de mama em tratamento quimioterápico adjuvante. **Rev Bras Cancerol**, v. 58, n. 4, p. 581-92, 2012.

GÜNTHER, W. et al. Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids. **British journal of cancer**, v. 88, n. 3, p. 463-469, 2003.

GUO, W.; GIANCOTTI, F. G. Integrin signalling during tumour progression. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5, n. 10, p. 816-26, Oct 2004.

GUPTA, G. P.; MASSAGUE, J. Cancer metastasis: building a framework. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 679-95, Nov 17 2006.

GUPTA, G. P. et al. Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. **Nature**, v. 446, n. 7137, p. 765-70, Apr 12 2007.

GUTIERREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 976-87, Dec 1 2009.

GUTIERREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 841-50, Sep-Oct 2000.

GUTIERREZ, J. M. et al. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 997-1011, Jun 15 2005.

HA, N. H.; HUNTER, K. W. Using a systems biology approach to understand and study the mechanisms of metastasis. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v. 6, n. 1, p. 107-14, Jan-Feb 2014.

HAFEEZ, B. B. et al. Tissue-specific conditional PKCepsilon knockout mice: a model to precisely reveal PKCepsilon functional role in initiation, promotion and progression of cancer. **Oncotarget**, Apr 20 2016.

HAJRASOULIHA, A. R. et al. Vascular endothelial growth factor-C promotes alloimmunity by amplifying antigen-presenting cell maturation and lymphangiogenesis. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 53, n. 3, p. 1244-50, Mar 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000.

HARPER, H. A. et al. **Harper: Bioquímica ilustrada/Bioquímica ilustrada**. e-libro, Corp., 2013. ISBN 6071509149.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-6, Oct 12 2000.

HOSNY, M. M. et al. Promoter Methylation Status of Breast Cancer Susceptibility Gene 1 and 17 Beta Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Gene in Sporadic Breast Cancer Patients. **Int J Breast Cancer**, v. 2016, p. 9545241, 2016.

HU, M. et al. Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition. **Cancer Cell**, v. 13, n. 5, p. 394-406, May 2008.

HUNTER, K. W.; CRAWFORD, N. P.; ALSARRAJ, J. Mechanisms of metastasis. **Breast Cancer Res**, v. 10 Suppl 1, p. S2, 2008.

HUSEMANN, Y. et al. Systemic spread is an early step in breast cancer. **Cancer Cell**, v. 13, n. 1, p. 58-68, Jan 2008.

INCA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil** Instituto Nacional de Câncer

José Alencar Gomes da Silva INCA, 2015. Rio de Janeiro 2015.

INDRAN, I. R. et al. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1807, n. 6, p. 735-45, Jun 2011.

JAMES, C. R. et al. BRCA1, a potential predictive biomarker in the treatment of breast cancer. **Oncologist**, v. 12, n. 2, p. 142-50, Feb 2007.

JIN, X.; MU, P. Targeting Breast Cancer Metastasis. **Breast Cancer (Auckl)**, v. 9, n. Suppl 1, p. 23-34, 2015.

KAMIGUTI, A. S.; ZUZEL, M.; THEAKSTON, R. D. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. **Braz J Med Biol Res**, v. 31, n. 7, p. 853-62, Jul 1998.

KAO, K. J. et al. Correlation of microarray-based breast cancer molecular subtypes and clinical outcomes: implications for treatment optimization. **BMC Cancer**, v. 11, p. 143, 2011.

KASIMIR-BAUER, P. D. S. Circulating tumor cells as markers for cancer risk assessment and treatment monitoring. **Molecular diagnosis & therapy**, v. 13, n. 4, p. 209-215, 2009.

KATAOKA, S.; TSURUO, T. Physician Education: Apoptosis. **Oncologist**, v. 1, n. 6, p. 399-401, 1996.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-57, Aug 1972.

KITAMURA, T.; QIAN, B. Z.; POLLARD, J. W. Immune cell promotion of metastasis. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 2, p. 73-86, Feb 2015.

KLAUS, A.; BIRCHMEIER, W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 5, p. 387-98, May 2008.

KNIZHNIK, A. V. et al. Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. **PLoS one**, v. 8, n. 1, p. e55665, 2013.

KROEMER, G.; MARIÑO, G.; LEVINE, B. Autophagy and the integrated stress response. **Molecular cell**, v. 40, n. 2, p. 280-293, 2010.

LAING, G. D. et al. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin necrosis. **European journal of immunology**, v. 33, n. 12, p. 3458-3463, 2003.

LEE, T. H. et al. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. **PLoS Med**, v. 4, n. 6, p. e186, Jun 2007.

LEVENTAL, K. R. et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 891-906, Nov 25 2009.

LI, L. et al. The apoptosis and proliferation of SAC-activated B cells by IL-10 are associated with changes in Bcl-2, Bcl-xL, and Mcl-1 expression. **Cell Immunol**, v. 178, n. 1, p. 33-41, May 25 1997.

LOPES, D. S. et al. Gene expression of inflammatory mediators induced by jararhagin on endothelial cells. **Toxicon**, v. 60, n. 6, p. 1072-84, Nov 2012.

LORIN, S. et al. Autophagy regulation and its role in cancer. **Seminars in cancer biology**, 2013. Elsevier. p.361-379.

LU, J.; TAN, M.; CAI, Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. **Cancer Lett**, v. 356, n. 2 Pt A, p. 156-64, Jan 28 2015.

MACDONALD, T. J. et al. Phase II study of cilengitide in the treatment of refractory or relapsed high-grade gliomas in children: a report from the Children's Oncology Group. **Neuro Oncol**, v. 15, n. 10, p. 1438-44, Oct 2013.

MARGAN, M. M. et al. Molecular Portrait of the Normal Human Breast Tissue and Its Influence on Breast Carcinogenesis. **J Breast Cancer**, v. 19, n. 2, p. 99-111, Jun 2016.

MARIA, D. A. et al. Antiproliferative effect of the jararhagin toxin on B16F10 murine melanoma. **BMC Complement Altern Med**, v. 14, p. 446, 2014.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749-800, Dec 1998.

MARSH, S.; LIU, G. Pharmacokinetics and pharmacogenomics in breast cancer chemotherapy. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 61, n. 5, p. 381-7, May 20 2009.

MARTIN, A.; CANO, A. Tumorigenesis: Twist1 links EMT to self-renewal. **Nat Cell Biol**, v. 12, n. 10, p. 924-5, Oct 2010.

MARUSAWA, H. et al. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. **Embo j**, v. 22, n. 11, p. 2729-40, Jun 2 2003.

MASSAGUÉ, J.; OBENAUF, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 298-306, 2016.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1477, n. 1-2, p. 146-56, Mar 7 2000.

MIMEAULT, M.; BATRA, S. K. Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer-and metastasis-initiating cells. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 17, n. 1, p. 30-54, 2013.

MIYAGI, T. et al. Plasma membrane-associated sialidase confers cancer initiation, promotion and progression. **Adv Exp Med Biol**, v. 842, p. 139-45, 2015.

MIYAMOTO, M. et al. High-temperature-required protein A2 as a predictive marker for response to chemotherapy and prognosis in patients with high-grade serous ovarian cancers. **Br J Cancer**, v. 112, n. 4, p. 739-44, Feb 17 2015.

MIZUSHIMA, N.; KOMATSU, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 728-741, 2011.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T.; OHSUMI, Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 27, p. 107-132, 2011.

MONSANTO, F. et al. Influência do tratamento de radioterapia na qualidade de vida dos doentes com cancro de mama. **Saúde & Tecnologia**, n. 9, p. 40-44, 2013.

MONTENEGRO, M. F. et al. Reactivation of the tumour suppressor RASSF1A in breast cancer by simultaneous targeting of DNA and E2F1 methylation. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52231, 2012.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; BALDO, C. Jararhagin, a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from *Bothrops jararaca*. **Toxicon**, v. 60, n. 3, p. 280-9, Sep 1 2012.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Curr Pharm Des**, v. 13, n. 28, p. 2893-905, 2007.

NAVES DE SOUZA, D. L. et al. Biochemical and enzymatic characterization of BpMP-I, a fibrinogenolytic metalloproteinase isolated from *Bothropoides pauloensis* snake venom. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 161, n. 2, p. 102-9, Feb 2012.

NELSON, D. L. **Lehninger princípios de bioquímica**. 5^a edição. 2011.

NGUYEN, D. X.; BOS, P. D.; MASSAGUE, J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 4, p. 274-84, Apr 2009.

NIKITENKO, L. L. Vascular endothelium in cancer. **Cell Tissue Res**, v. 335, n. 1, p. 223-40, Jan 2009.

NIKOLETOPOULOU, V. et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 3448-3459, 2013.

NOLTE, S. et al. BJcul, a lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom, induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by inhibition of cell adhesion and actin cytoskeleton disassembly. **Toxicon**, v. 59, n. 1, p. 81-5, Jan 2012.

NUNES, T.; BERNARDAZZI, C.; DE SOUZA, H. S. Cell Death and Inflammatory Bowel Diseases: Apoptosis, Necrosis, and Autophagy in the Intestinal Epithelium. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Prolif**, v. 45, n. 6, p. 487-98, Dec 2012.

PAINÉ, M. J. et al. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from Bothrops jararaca venom. Insights into the disintegrin gene family. **J Biol Chem**, v. 267, n. 32, p. 22869-76, Nov 15 1992.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, p. 138-144, 2001.

PATENAUME, A.; PARKER, J.; KARSAN, A. Involvement of endothelial progenitor cells in tumor vascularization. **Microvasc Res**, v. 79, n. 3, p. 217-23, May 2010.

PENCHEVA, N. et al. Convergent multi-miRNA targeting of ApoE drives LRP1/LRP8-dependent melanoma metastasis and angiogenesis. **Cell**, v. 151, n. 5, p. 1068-82, Nov 21 2012.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-52, Aug 17 2000.

PICCART-GEBHART, M. J. et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med**, v. 353, n. 16, p. 1659-72, Oct 20 2005.

PIEROTTI, M. A.; SOZZI, G.; CROCE, C. M. Oncogenes. 2003.

PINHO, M. Angiogênese: o gatilho proliferativo. **Rev Bras Coloproctol**, v. 25, p. 396-402, 2005.

POLSON, H. E. et al. Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. **Autophagy**, v. 6, n. 4, p. 506-522, 2010.

POSTE, G.; FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis. **Nature**, v. 283, n. 5743, p. 139-146, 1980.

RAKHA, E. A. et al. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. **Cancer**, v. 109, n. 1, p. 25-32, Jan 1 2007.

RÉCAMIER, J. C. A. **Recherches sur le traitement du cancer par la compression méthodique simple ou combinée et sur l'histoire générale de la même maladie**. Paris: chez Gabon, 1829.

REED, J. C. Dysregulation of apoptosis in cancer. **J Clin Oncol**, v. 17, n. 9, p. 2941-53, Sep 1999.

REIS-FILHO, J. S.; TUTT, A. N. Triple negative tumours: a critical review. **Histopathology**, v. 52, n. 1, p. 108-18, Jan 2008.

RODRIGUES, R. S. et al. Combined snake venomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **J Proteomics**, v. 75, n. 9, p. 2707-20, May 17 2012.

RODRIGUES, V. M. et al. *Bothrops pauloensis* snake venom toxins: the search for new therapeutic models. **Curr Top Med Chem**, v. 15, n. 7, p. 670-84, 2015.

ROMAGNOLI, G. G. Fatores de crescimento e citocinas envolvidos na angiogênese de melanoma em animais selecionados pela intensidade da resposta inflamatória aguda. 2007.

ROMOND, E. H. et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med**, v. 353, n. 16, p. 1673-84, Oct 20 2005.

ROQUE, V. M. N.; FORONES, N. M. Avaliação da qualidade de vida e toxicidades em pacientes com câncer colorretal tratados com quimioterapia adjuvante baseada em fluoropirimidinas. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 43, p. 94-101, 2006.

RUAN, K.; SONG, G.; OUYANG, G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. **J Cell Biochem**, v. 107, n. 6, p. 1053-62, Aug 15 2009.

RUNDQVIST, H.; JOHNSON, R. Tumour oxygenation: implications for breast cancer prognosis. **Journal of internal medicine**, v. 274, n. 2, p. 105-112, 2013.

SADRI, N.; ZHANG, P. J. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression; prognostic and therapeutic targets in soft tissue sarcomas. **Cancers**, v. 5, n. 2, p. 320-333, 2013.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIZAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 627-45, Apr 2011.

SALAVERRY, O. [Cancer etymology and its historical curious course]. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, v. 30, n. 1, p. 137-41, Mar 2013.

SANCHES JUNIOR, J. A. et al. Reações tegumentares adversas relacionadas aos agentes antineoplásicos: parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, p. 425-437, 2010.

SCHMITT, C. A. Cellular senescence and cancer treatment. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1775, n. 1, p. 5-20, 2007.

SCHMITT, F. C. L. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 30, n. 1, p. 42-7, 2008.

SEGUIN, L. et al. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. **Trends Cell Biol**, v. 25, n. 4, p. 234-40, Apr 2015.

SEMENTZA, G. L. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. **Trends in molecular medicine**, v. 8, n. 4, p. S62-S67, 2002.

_____. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 9, p. 3664-3671, 2013.

SERRANO, R.; THEODORO, T. R.; DA SILVA PINHAL, M. A. Oncogenes, genes supressores de tumores, microRNAs e o desenvolvimento de tumores. **RBM rev. bras. med**, v. 71, n. esp. a2, 2014.

SHIBUYA, M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. **Genes Cancer**, v. 2, n. 12, p. 1097-105, Dec 2011.

SHIMIZU, M. et al. A newly synthesized compound, 4'-geranyloxyferulic acid-N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester suppresses inflammation-associated

colorectal carcinogenesis in male mice. **Int J Cancer**, v. 135, n. 4, p. 774-84, Aug 15 2014.

SHIMOKAWA, K. et al. Expression, activation, and processing of the recombinant snake venom metalloproteinase, pro-atrolysin E. **Arch Biochem Biophys**, v. 335, n. 2, p. 283-94, Nov 15 1996.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 1, p. 5-29, 2015.

SILVA, L. C. D. Câncer de mama e sofrimento psicológico: aspectos relacionados ao feminino. **Psicologia em Estudo**, v. 13, p. 231-237, 2008.

SILVÉRIO DA SILVA, A. P. **Importância da apoptose nas neoplasias hematopoiéticas**.

Metodologias usadas e novos fármacos. 2014. Tese de Mestrado (FACULDADE DE FÁRMACIA). UNIVERSIDADE DE LISBOA, Lisboa.

SIMONSEN, A.; TOOZE, S. A. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. **The Journal of cell biology**, v. 186, n. 6, p. 773-782, 2009.

SIZIOPIKOU, K. P. Ductal carcinoma in situ of the breast: current concepts and future directions. **Arch Pathol Lab Med**, v. 137, n. 4, p. 462-6, Apr 2013.

SLAMON, D. et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med**, v. 365, n. 14, p. 1273-83, Oct 6 2011.

SLEDGE, G. W. et al. Past, present, and future challenges in breast cancer treatment. **J Clin Oncol**, v. 32, n. 19, p. 1979-86, Jul 1 2014.

SORLIE, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. **Eur J Cancer**, v. 40, n. 18, p. 2667-75, Dec 2004.

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 19, p. 10869-74, Sep 11 2001.

SORLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 14, p. 8418-23, Jul 8 2003.

SOUZA, W. F. D. et al. Sinalização celular em câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, p. 30-33, 2014.

STIVAL, R. S. M.; PRESTES, A. L. D. O.; MANSANI, F. P. Câncer de mama em mulheres jovens: uma análise do estadiamento clínico inicial e dos subtipos moleculares dos tumores. **Rev Bras Mastologia. Ponta Grossa (PR)**, v. 24, n. 1, p. 17-22, 2014.

STOCKER, W.; BODE, W. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. **Curr Opin Struct Biol**, v. 5, n. 3, p. 383-90, Jun 1995.

STOCKER, W. et al. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Sci**, v. 4, n. 5, p. 823-40, May 1995.

SUN, W. L. Ambra1 in autophagy and apoptosis: Implications for cell survival and chemotherapy resistance (Review). 2016.

TAKAHASHI, H.; SHIBUYA, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. **Clin Sci (Lond)**, v. 109, n. 3, p. 227-41, Sep 2005.

TALMADGE, J. E.; FIDLER, I. J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. **Cancer Res**, v. 70, n. 14, p. 5649-69, Jul 15 2010.

TANAKA, T. et al. Chemical-induced carcinogenesis. **Journal of Experimental & Clinical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 203-209, 2013.

TAVASSOLI, F. A.; DEVILEE, P. **Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs**. Iarc, 2003. ISBN 9283224124.

TEKLEMARIAM, T. et al. Functional analysis of a recombinant PIII-SVMP, GST-acocostatin; an apoptotic inducer of HUVEC and HeLa, but not SK-Mel-28 cells. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 646-56, Apr 2011.

THOMPSON, C. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v. 267, n. 5203, p. 1456-1462, 1995-03-10 00:00:00 1995.

TOGNON, R.; NUNES, N. D. S.; CASTRO, F. A. D. Desregulação da apoptose em neoplasias mieloproliferativas crônicas. **Einstein (São Paulo)**, v. 11, p. 540-544, 2013.

TOMAO, F. et al. Triple-negative breast cancer: new perspectives for targeted therapies. **Onco Targets Ther**, v. 8, p. 177-93, 2015.

TUNG, K.-H. et al. CHC promotes tumor growth and angiogenesis through regulation of HIF-1 α and VEGF signaling. **Cancer letters**, v. 331, n. 1, p. 58-67, 2013.

TURNER, N. C. et al. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 14, p. 2126-32, Mar 29 2007.

UCUZIAN, A. A. et al. Molecular mediators of angiogenesis. **J Burn Care Res**, v. 31, n. 1, p. 158-75, Jan-Feb 2010.

VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 275-92, Oct 14 2011.

VALIATTI, F. B. et al. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis and diabetic retinopathy. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 55, n. 2, p. 106-113, 2011.

VANLANGENAKKER, N. et al. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. **Current molecular medicine**, v. 8, n. 3, p. 207-220, 2008.

VASUDEV, N. S.; REYNOLDS, A. R. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. **Angiogenesis**, v. 17, n. 3, p. 471-494, 2014.

VILA, C. et al. Advanced breast cancer clinical nursing curriculum: review and recommendations. **Clin Transl Oncol**, Aug 3 2016.

VINCENT, T. L.; GATENBY, R. A. An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. **Int J Oncol**, v. 32, n. 4, p. 729-37, Apr 2008.

VYAS, V. K. et al. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 3, n. 2, p. 156-62, Feb 2013.

WAN, S. G. et al. A snake venom metalloproteinase that inhibited cell proliferation and induced morphological changes of ECV304 cells. **Toxicon**, v. 47, n. 4, p. 480-9, Mar 15 2006.

WANG, K. et al. Estimation of tumor heterogeneity using CGH array data. **BMC bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 1, 2009.

WANG, L. et al. Predictors of persistent pain after breast cancer surgery: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **Cmaj**, Jul 11 2016.

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, p. 351-360, 2002.

WEI, X. L. et al. ERalpha inhibits epithelial-mesenchymal transition by suppressing Bmi1 in breast cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 25, p. 21704-17, Aug 28 2015.

WEINBERG, R. A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. **Cancer Res**, v. 49, n. 14, p. 3713-21, Jul 15 1989.

WEIS, S. M.; CHERESH, D. A. α V integrins in angiogenesis and cancer. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 1, n. 1, p. a006478, 2011.

WEISS, L. Metastatic inefficiency. **Advances in cancer research**, v. 54, p. 159-211, 1990.

WELTI, J. et al. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 8, p. 3190-3200, 2013.

WESTBROOK, K.; STEARNS, V. Pharmacogenomics of breast cancer therapy: an update. **Pharmacol Ther**, v. 139, n. 1, p. 1-11, Jul 2013.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 951-67, Jun 15 2005.

WHO. Breast Cancer: prevention and control., 2015.

WIJEYEWICKREMA, L. C.; BERNDT, M. C.; ANDREWS, R. K. Snake venom probes of platelet adhesion receptors and their ligands. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1051-61, Jun 15 2005.

WILLIAMS, M. M.; COOK, R. S. Bcl-2 family proteins in breast development and cancer: could Mcl-1 targeting overcome therapeutic resistance? **Oncotarget**, v. 6, n. 6, p. 3519-30, Feb 28 2015.

YANG, J. et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. **Cell**, v. 117, n. 7, p. 927-39, Jun 25 2004.

YU, H.; MOHAN, S.; NATARAJAN, M. Radiation-Triggered NF-[kappa] B activation is responsible for the angiogenic signaling pathway and neovascularization for breast cancer cell proliferation and growth. **Breast cancer: basic and clinical research**, v. 6, p. 125, 2012.

ZHANG, L.; WEI, L. J. ACTX-8, a cytotoxic L-amino acid oxidase isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom, induces apoptosis in HeLa cervical cancer cells. **Life Sci**, v. 80, n. 13, p. 1189-97, Mar 6 2007.

CAPÍTULO 2

***In vitro* antitumor and antiangiogenic effects of Bothropoidin, a metalloproteinase from *Bothrops pauloensis* snake venom**

Denise de Oliveira Guimarães¹, Daiana Silva Lopes^{1*}, Fernanda Van Petten Vasconcelos Azevedo¹, Sarah Natalie Gimenes¹, Makswell Almeida Silva¹, David Collares Achê¹, Mário Sérgio Rocha Gomes³, Lara Vecchi², Luiz Ricardo Goulart², Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama¹, Renata Santos Rodrigues¹, Veridiana de Melo Rodrigues^{1*}.

¹Laboratory of Biochemistry and Animal Toxins, Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlandia, UFU, Uberlandia-MG, Brazil;

²Laboratory of Nanobiotechnology, Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlandia, UFU, Uberlandia-MG, Brazil; ³Department of Chemical and Physical, State University of Southwest Bahia (UESB), 45506-210 Jequie, BA, Brazil.

*Corresponding author: Dr. Daiana Silva Lopes and Prof. Dr. Veridiana de Melo Rodrigues.

E-mail: lsdaiana@yahoo.com.br; veridiana@ufu.br

Phone: +55 34-3225-8436 r 22 Fax: +55 34-3225-8436 r 24.

Laboratory address: Para Avenue, 1720. CEP: 38400-902. Uberlandia-MG, Brazil.

Abstract

Breast cancer is a highly malignant carcinoma and remains the second leading cause of mortality among women. The antitumor effects of metalloproteinases and disintegrins from snake venom on various types of cancer cells have been investigated. In this study, we evaluated the antitumor and antiangiogenic effects on MDA-MB-231 human breast cancer cells and endothelial cells induced by Bothropoidin, a disintegrin-like metalloproteinase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. At 24h after treatment at 100 μ g/mL, Bothropoidin exerted a moderate cytotoxic effect of 30% on MDA-MB-231 versus 10% cytotoxicity against MCF10A (a non-tumorigenic breast cell line), a significant difference that suggests a possible preference by this protein for targets in cancer cells. Early and late apoptosis of MDA-MB-231 was observed after Bothropoidin treatment (10 μ g/mL and 40 μ g/mL). Furthermore, this toxin inhibited not only the adhesion of MDA-MB-231 cells in a dose-dependent manner but also cell migration by approximately 45%. In addition, Bothropoidin decreased endothelial cells viability and adhesion in Matrigel and inhibited *in vitro* angiogenesis in Matrigel stimulated by bFGF, showing significantly fewer formed vessels. The results demonstrated that Bothropoidin has potent *in vitro* antitumor and antiangiogenic effect and represents a biotechnological tool for elucidating the antitumor effect of disintegrins-like metalloproteinases in cancer cells.

Key words: snake venom metalloproteinase, MDA-MB-231 cells, antitumor, antiangiogenic.

1. Introduction

Breast cancer is the most common malignant disease in women [1] and has been responsible for a significant increase of mortality in the last decade in Latin America [2]. According to the National Cancer Institute José Alencar Gomes da Silva (INCA) in Brazil, 57,960 new cases of breast cancer are expected in 2016, with an estimated risk of 56.20 cases per 100,000 women.

Cancer cells are characterized by uncontrolled cellular growth, loss of apoptotic ability, invasion into surrounding tissues and metastasis [3, 4]. Metastasis is responsible for more than 90% of cancer-associated mortality [5, 6], an event that requires several interrelated molecular mechanisms that can induce cell adhesion, migration through the extracellular matrix as well as angiogenesis [5, 6].

Cell-cell and cell-matrix signaling, communication between adhesion sites and migration of cells are important in the overall architecture and maintenance of tissue integrity; however, these cellular functions and mechanisms are often deregulated in cancer [7, 8]. In addition, events such as adhesion, migration and proliferation of endothelial cells are very important for tumor angiogenesis, which is required to sustain malignant cells with nutrients and oxygen for tumor growth [9, 10], whereas the development of new blood vessels in the tumor also facilitates metastasis formation [10, 11]. Consequently, preventing this process is important for inhibiting both tumor growth and metastasis [12, 13].

Cell-matrix adhesions, cell migration, proliferation, differentiation and survival of cells, observed in many biological processes, are regulated by cell adhesion receptors known as integrins [14, 15]. Thus, integrins contribute to cancer progression [16] and play an important role in proliferation, survival, tumor angiogenesis and metastasis [17, 18]. The expression of integrins may vary

significantly between normal and cancer tissue and thus they can be used as selective targets in cancer therapy [19]. Therefore, integrin antagonists are continuously employed for their antitumor potential and ability to reduce metastasis, such as Cilengitide, an $\alpha\beta 3/\alpha\beta 5$ integrin inhibitor currently used in clinical trials for anti-cancer therapy [20-23].

Disintegrins and some metalloproteinases from snake venom are natural integrin antagonists characterized by their ability to interact with many integrins expressed by a number of cells; these toxins are frequently investigated as targets for the development of cancer therapy [24-28]. Disintegrins constitute a family of low-molecular-weight proteins from snake venoms that specifically bind cell surface integrins on different cell types. Most disintegrins present an RGD (Arg-Gly-Asp) motif located near the C-terminal that serves as the primary recognition site in extracellular matrix proteins [29, 30].

Snake venom metalloproteinases (SVMPs) can trigger hemorrhaging by causing changes in blood coagulation or interaction with the main components of the extracellular matrix such as collagen, laminin, and fibronectin [31, 32]. These proteins are classified according to their structure into the following classes: P-I, which has only a metalloproteinase domain, P-II, which contains a metalloproteinase followed by a disintegrin domain and P-III, which presents a catalytic Zn-dependent metalloproteinase, a disintegrin-like domain and cystein-rich domain. P-III SVMPs can be divided into subclasses based on their distinct post-translational modifications (P-IIIa, P-IIIb, P-IIIc and P-IIIId) [33].

Gomes et al. (2014) [34] isolated and showed the structural and functional characteristics of a hemorrhagic metalloproteinase denominated Bothropoidin from *Bothrops pauloensis*. The P-III metalloproteinase Bothropoidin has a molecular mass

of 49,000 Da and exerts significant proteolytic activity on azocasein, Aa-chain of fibrinogen, fibrin, collagen and fibronectin. In addition, this toxin is able to inhibit collagen and ADP-induced platelet aggregation and to interfere with the viability and cell adhesion of endothelial cells. Given these functional properties, in this work we investigated the *in vitro* antitumor and antiangiogenic activities of Bothropoidin.

2. Materials and methods

2.1. *Venom*

Bothrops pauloensis snakes were kept at Serpentarium Bioagents, LTDA, Batatais-SP, Brazil which is registered in the Brazilian Institute of the Environment and Renewable Natural Resources (number 471301). Venom was collected, centrifuged, lyophilized and stored at -20°C until use. This study was authorized by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil for access to and remittance of genetic patrimony (number 010 453/2014-8).

2.2. *Bothropoidin purification*

Bothropoidin isolation was conducted similarly as previously described by Gomes, et al., 2015 [34] using three chromatographic steps on cation-exchange CM-Sepharose, size-exclusion Sephacryl S-300 HR HiPrep 26/60 and anion-exchange Capto Q columns. The sample homogeneity was confirmed by reverse-phase chromatography in an HPLC system using a C2C18 column and by 12.5% SDS-PAGE [35].

2.3. Cell culture

Breast cancer cell - MDA-MB-231(ATCC® HTB-26™) and non-tumorigenic breast cell lines - MCF10A (ATCC® CRL-101317™) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, USA). Murine endothelial cell line derived from thymus hemangioma (tEnd) was kindly provided by Dr. Patricia Clissa from the Butantan Institute. Cells were maintained as a monolayer culture in a humidified incubator containing 5% CO₂ at 37°C. MDA-MB-231 cells were cultivated in IMDM medium (Sigma Aldrich, Brazil) supplemented with 10% bovine fetal serum (FBS), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. MCF10A cells were maintained in DMEM F12 medium (Sigma Aldrich, Brazil) supplemented with EGF 20 ng/mL, hydrocortisone 0.5 µg/mL and insulin 10 µg/mL (Thermo Fisher Scientific, Brazil) and 10% FBS, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Sigma Aldrich, Brazil). The tEnd cells were cultivated in RPMI 1640 medium (Sigma Aldrich, Brazil) containing 10% FBS 2 mM L-glutamine, 2 mM sodium pyruvate, 1 mM non-essential amino acids, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin.

2.4. Cell viability

Cell viability of cultures treated with Bothropoidin was evaluated by the colorimetric MTT assay ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) bromide). The cells (5×10^4 cells/well) were seeded into a 96-well plate for adhesion. After 24h the cells were incubated with medium in the absence (control cells) or presence of different concentrations of Bothropoidin (100, 50, 25, 12.5 and 3.125 µg/mL) at 37 °C and 5% CO₂. After 24 h the cells were incubated with MTT reagent (5 mg/mL, 20 µL/well) for 3 h and the formazan crystals were dissolved by 100 µL of phosphate buffered saline (PBS) containing 10% SDS and 0.01 N HCl. After 18 h the

optical density was determined at 570 nm in a plate reader (Multiskan GO Thermo Scientific, USA).

Apoptosis assay

Apoptosis was assessed by staining with Annexin V-FITC and propidium iodide (PI) using the apoptosis detection kit (BD Biosciences, Brazil), according to the manufacturer's protocol. MDA-MB-231 cells (2×10^5 /well) were placed in 12-well culture plates at 37°C and 5% CO₂. After 24 h cells were incubated with medium in absence (control cells) or presence of Bothropoidin (10 and 40 µg/mL). After 24 h cells were incubated with 5 µL of annexin V-FITC and 2 µL PI for 30 min at 25°C. After incubation the cells were examined by flow cytometry (BD Accure C6, USA) and analyzed via the software FlowJo (FlowJo v.7.6.5; Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

2.6. Cell adhesion assay

For this assay cells (6×10^4 cells/well) previously incubated for 30 min at 37°C with medium in the absence (control cells) or presence of different concentrations of Bothropoidin (5, 10, 20 and 40 µg/mL) were added to a 96-well plate previously coated or not coated with Matrigel 1 mg/mL (Corning® Matrigel® Matrix, USA) for 1 h at 37 °C. After 2 h, the detached cells were removed by two careful washes with PBS. The adherent cells were quantified by the MTT assay as described previously and cells were photographed under a microscope at $\times 20$ magnification.

2.7. Wound-healing assay

The wound-healing assay was performed to measure the effects of Bothropoidin on cell migration [36]. MDA-MB-231 cells (2×10^5 cells/well) were seeded on 24-well plate and allowed to grow to confluence at 37°C. The medium was then discarded and culture cell monolayers were scratched using a plastic pipette tip. Then, the cell monolayers were incubated with medium in the absence (control cells) or presence of Bothropoidin (10 µg/mL). Migration evaluation was conducted at 24h, with photographs taken at 0 and 24 h, whereas the percent migration of cells was calculated using the equation $[(S - F)/S] \times 100$, where S is the distance (mm) of the cell edge at 0 h, and F is the distance (mm) of the cell edge at 24h.

2.8. In vitro angiogenesis assay

The effect of Bothropoidin on formation of capillary networks was evaluated by Matrigel tube formation assays [37]. For this assay, tEnds cells (2×10^4 cells/well) were preincubated with 40µg/mL of Bothropoidin for 30 min at 37°C. After incubation cells were added to cell culture chamber slide coated with 50µl of Matrigel 5.25 mg/mL (Corning® Matrigel® Matrix, USA) and incubated with culture medium supplemented with bFGF (30 ng/mL) (Thermo Fisher Scientific, Brazil) for 18 h. Cells incubated only with medium were used as control. The cells were photographed under a microscope at $\times 20$ magnification and the vessels were counted.

2.9. Statistical analysis

The experiments were performed in triplicate and the results were presented as mean \pm standard deviation (S.D.). Statistical significant values were compared to controls by either the Student's *t* test or one-way ANOVA, followed by Tukey's test using the software Prism GraphPad 5 (GraphPad Software, Inc.). A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results and Discussion

The use of integrin antagonists from snake venom as potential therapeutics has been increasing in pharmaceutical research studies as a potential / on anticancer therapy [25, 28, 38]. In this context, the search for new components in snake venoms, as well as the comprehension of their action mechanism have been relevant. In this work, we demonstrated *in vitro* antitumor and antiangiogenic effects of Bothropoidin, a disintegrin-like metalloproteinase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom.

Initially the viability of MDA-MB-231 cells was evaluated by MTT assay; and according to our results, Bothropoidin showed significant cytotoxicity toward this cell line, with approximately 30% cytotoxicity at 100 μ g/mL at 24h after treatment (Figure 1A). Surprisingly, the cytotoxic potential of Bothropoidin was significantly lower against MCF10A (Figure 1B) at the same concentration, showing only approximately 10% cytotoxicity. Some SVMPs are capable of inducing antitumor activity in different cancer cell lines [26, 39, 40], such as Leucurolysin-B (leuc-B), a class PIII metalloproteinase isolated from *Bothrops leucurus*, which also showed a remarkable cytotoxic effect against breast cancer, glioblastoma, Ehrlich ascites carcinoma and melanoma cell lines [41].

Although Bothropoidin has induced a cytotoxic activity on MDA-MB-231 cells, it did not affect significantly the viability of non-tumorigenic breast cell line (MCF10A) suggesting that this protein may preferentially target cancer cells. However, despite the prior abundant research on the biotechnological potential of SVMPs, until now, few studies have investigated therapeutic potential upon different cancer cell lines [26, 40-42]. This scarcity is probably attributable to their toxic effects, complex structure and the presence of different pharmacologically active motifs in this class of molecules.

Apoptosis is a key mechanism for most cancer therapies [43, 44]. Thus, we investigated whether the observed cytotoxic effects of Bothropoidin on MDA-MB-231 cell are mediated via apoptosis. Bothropoidin significantly increased early and late apoptosis of MDA-MB-231 cells. As shown in Figure 2, treatment with Bothropoidin (10 and 40 μ g/mL) caused late apoptosis of MDA-MB-231 human breast cancer cells (13 and 22%, respectively). Low percentages of necrotic cells were observed in cells treated with Bothropoidin. Jararhagin, a disintegrin-like metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom, also induces apoptosis and causes DNA fragmentation by activation of caspase-3 in B16F10 melanoma cells. In addition, anoikis is the main mechanism associated with jararhagin-induced apoptosis in endothelial cells [45]. Anoikis is a type of apoptosis that occurs as a consequence of the disruption of cell-matrix interactions by matrix metalloproteinases (MMPs) [46, 47]. Apoptosis induced by jararhagin in endothelial cells was completely dependent on catalytic activity and comprised a rapid change in cytoskeleton dynamics with cell retraction, rearrangement of the actin network and a decrease in FAK association with actin and in tyrosine-phosphorylated proteins, suggesting an interference with focal adhesion contacts [45]. However, other SVMPs show distinct effects on

endothelial cell apoptosis; VAP1, a metalloproteinase/disintegrin from *Crotalus atrox*, induces apoptosis with no degradation of extracellular matrix or interference in endothelial cell adhesion [48]. Thus, action of this SVMP on endothelial cells may involve a direct effect of the disintegrin domain on integrin receptors. Interestingly, Bothropoidin was able to degrade ECM components [34]; nevertheless, the mechanism of Bothropoidin-induced cytotoxicity and apoptosis in MDA-MB-231 cells still needs to be investigated.

Metastasis is a property of malignant cancer cells, where they require the involvement of integrins in a number of signaling events such as migration and invasion of tumor cells [5, 49]; and the integrins may constitute interesting targets of drugs utilized to inhibit several steps of the metastatic cascade and the tumor microenvironment. Therefore, in this study we also investigated the influence of the disintegrin-like metalloproteinase Bothropoidin on adhesion and migration of MDA-MB-231, a highly metastatic human breast cancer cell line. As shown in Figure 3, Bothropoidin inhibited the adhesion of MDA-MB-231 cells in a dose-dependent manner; at the concentration of 10 µg/mL, it also inhibited the cell migration by approximately 45% when compared to the untreated control throughout 24 h (Figure 4). The scratches in the untreated MDA-MB-231 control had closed 100% after 24 h. DisBa-01, an $\alpha\beta 3$ integrin-blocking RGD-disintegrin, also inhibits migration of MDA-MB-231 cell in a concentration-dependent fashion [38]. Interestingly the recombinant disintegrin domain of ADAM9 strongly inhibited breast tumor cell invasion on Matrigel and binds to MDA-MB-231 cells by $\beta 1$, $\alpha 3$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$ and $\alpha 2$ integrins [50]. The ADAM (A Disintegrin And Metallopeptidase) are a family of proteins that comprise a snake venom-homolog group of multidomain proteins implicated in multiple biological processes including proteolysis, cell adhesion, cell fusion, cell proliferation and cell

migration [51]. Thus, we suggest a key role for these domains (Disintegrin and Metallopeptidase) in Bothropoidin-induced adhesion and migration inhibition.

Given that metastasis and tumor growth require angiogenesis, tumor-recruited microvascular endothelial cells have become an important target in cancer therapy. Thus, a number of antiangiogenic factors are currently being tested in clinical trials [10, 52]. Therefore, we study the antiangiogenic properties of Bothropoidin. We first investigated whether Bothropoidin affects the viability of endothelial cells. Our results showed that this protein decreased tEnd cell viability at concentrations higher than 20 μ g/mL (Figure 5A). In addition, Bothropoidin (40 μ g/mL) inhibited the adhesion to extracellular matrix proteins (Figure 5C) when compared to control cells (Figure 5B).

New blood vessel formation includes the migration of endothelial cells from the existing capillaries, release of several angiogenic factors, which include vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoetins, basic fibroblast growth factor (bFGF), and morphogenic rearrangement of endothelial cell into a tube-like structure [36]. In order to investigate the ability of Bothropoidin to inhibit tube formation, its effect in a Matrigel angiogenesis assay was investigated. *In vitro* angiogenesis assays were performed using tEnd cells pretreated with Bothropoidin (40 μ g/mL). Capillary-like structure formation (tubular angiogenesis) in Matrigel previously stimulated with bFGF (Figure 6A, control cells) were strongly inhibited. Bothropoidin (Figure 6B), showing significant reduction in the number of vessels formed (Figure 6C). DisBa-01, a recombinant disintegrin from *Bothrops alternatus*, inhibits bFGF-induced angiogenesis in nude mice under the Matrigel plug assay and strongly inhibits the expression of VEGF and its receptors in endothelial cells, effects that are probably mediated by $\alpha\beta 3$ integrin inhibition[53]. The recombinant disintegrins r-

Viridistatin 2 and r-Mojastin 1, derived from the Mohave and Prairie rattlesnakes, also can inhibit bFGF-elicited angiogenesis *in vitro* in the Matrigel assay [54], an effect attributable to inhibition of integrins, since both recombinant disintegrins bind to $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$ receptors. In addition, Leucurogin, a recombinant disintegrin-like cloned from *Bothrops leucurus* SVMP, showed potent inhibition of the vascularization process in a sponge implant model [42].

Bothropoidin presents the disintegrin-like domain and probably inhibits adhesion and angiogenesis by binding to integrins on the cell surface. Gomes et al. (2015) demonstrated that Bothropoidin at 40 μ g/mL is able to induce significant detachment of endothelial cells even after removal of the zinc from the catalytic site by EDTA [34], thus showing the importance of disintegrin-like domain for this action. However, the catalytic domain may also be responsible for this effect. The PIII SVMP jararhagin produced complete inhibition of tEnd cell detachment when preincubated with EDTA [45], whereas BpMP-II, a PI SVMP isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom, was also able to inhibit *in vitro* angiogenesis probably by a proteolytic mechanism [55]. Therefore, SVMPs can interfere with the viability and adhesion of endothelial cells by degradation of extracellular matrix proteins such as fibronectin, vitronectin, collagen I and collagen IV or plasma proteins [31, 32, 56].

Thus, antiangiogenic activity *in vitro* induced by Bothropoidin evaluated by inhibition of tEnd cell adhesion and tube formation in the Matrigel assay may be related to interaction of this protein with cell surface integrins and/or by degradation of extracellular matrix proteins; however, the exact mechanism involved in this process must be further elucidated.

Conclusion

We provide preliminary data showing that Bothropoidin inhibits some processes involved in tumor growth and metastasis *in vitro*, including apoptosis, cell adhesion, migration and angiogenesis. However, further studies on functional inhibition using integrins monoclonal antibodies would greatly facilitate the elucidation of the exact molecular mechanism involved in the action of this disintegrin-like metalloproteinase on breast cancer cell.

Conflicts of interest

The authors declared that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), National Institute of Science and Technology (INCT) in Nano-Biopharmaceutics, Brazil.

Caption of figures

Figure 1. Analysis of cytotoxicity of Bothropoidin on MDA-MB-231 and MCF10A cells by MTT assay. MDA-MB-231 (A) and MCF10A (B) cultures were treated with different concentrations (100, 50, 25, 12.5, 6.25 and 3.125 μ g/mL) of Bothropoidin for 24 h. These results are representative of at least 3 independent experiments. Data show the mean \pm standard deviation (S.D.). *Statistically significant difference ($p < 0.05$) compared with control.

Figure 2. Analysis of apoptosis by flow cytometry of MDA-MB-231 cells. After treatment with Bothropoidin (10 and 40 μ g/mL) the cells were collected and subjected to Annexin V-FITC/Propidium Iodide (PI) double staining. Stained cells were counted by flow cytometry. A) The representative dotplot acquisitions show the distribution of MDA-MB-231 cells presenting necrosis (upper left quadrant), early apoptosis (lower right quadrant) and late apoptosis (upper right quadrant). B) The graphs display the percentages of apoptotic and necrotic cells. These results are representative of at least 3 independent experiments. Results are expressed as mean \pm S.D. *Statistically significant difference ($p < 0.05$) compared with control.

Figure 3. Effect of Bothropoidin on adhesion of MDA-MB-231 cells. Cells were preincubated with Bothropoidin (5, 10, 20 and 40 μ g/mL) for 30 min; the percentage of adherent cells after treatments was determined by the MTT assay. These results are representative of at least 3 independent experiments. Results are expressed as mean \pm S.D.

Figure 4. Effect of Bothropoidin on cell migration of MDA-MB-231. Cells were cultured until obtaining complete confluence. A line was scratched through the cell

monolayer (0 h) (A and C). After 24 h, the cell migration capacities were evaluated in the absence (B) or presence of Bothropoidin (10 μ g/mL) (D) by extent of wound closure using optical microscopy. (E) The graphs display the percent migration of cells after 24 h. These results are representative of at least 3 independent experiments. Results are expressed as mean \pm S.D. *Statistically significant difference ($p < 0.05$) compared with control.

Figure 5. Effect of Bothropoidin on viability and adhesion of tEnd cells in Matrigel. (A) Cells were treated with different concentrations (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 and 0.312 μ g/mL) of Bothropoidin for 24 h and analyzed by MTT assay. (B) tEnd cells were incubated in the (B) absence or (C) presence of Bothropoidin (40 μ g/mL) after seeding on Matrigel and images were registered under magnification of $\times 20$. These results are representative of 3 independent experiments. Data show the mean \pm standard deviation (S.D.). *Statistically significant difference ($p < 0.05$) compared with control.

Figure 6. *In vitro* anti-angiogenic effect of Bothropoidin. For the angiogenesis assay the cells were incubated in the (A) absence or (B) presence of Bothropoidin (40 μ g/mL) after seeding on Matrigel and photographs were taken after 18h. The number of vessels was quantified (C) and these results are representative of at least 3 independent experiments. *Statistically significant difference ($p < 0.05$) compared with control.

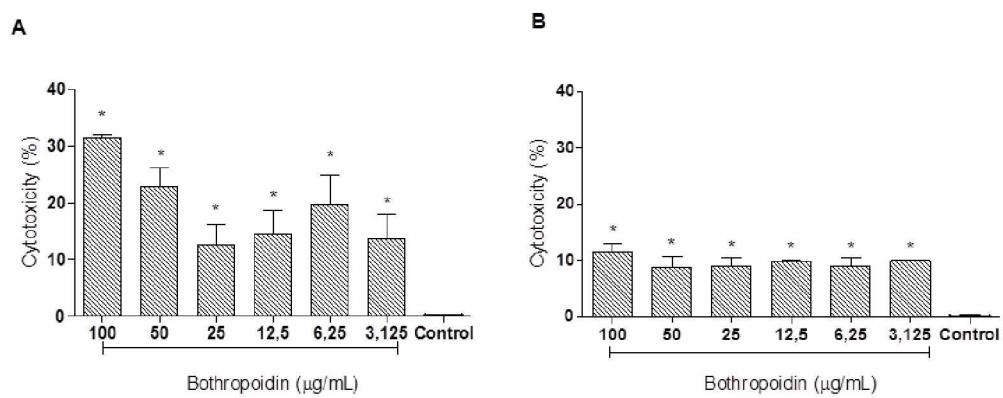
Figure 1.

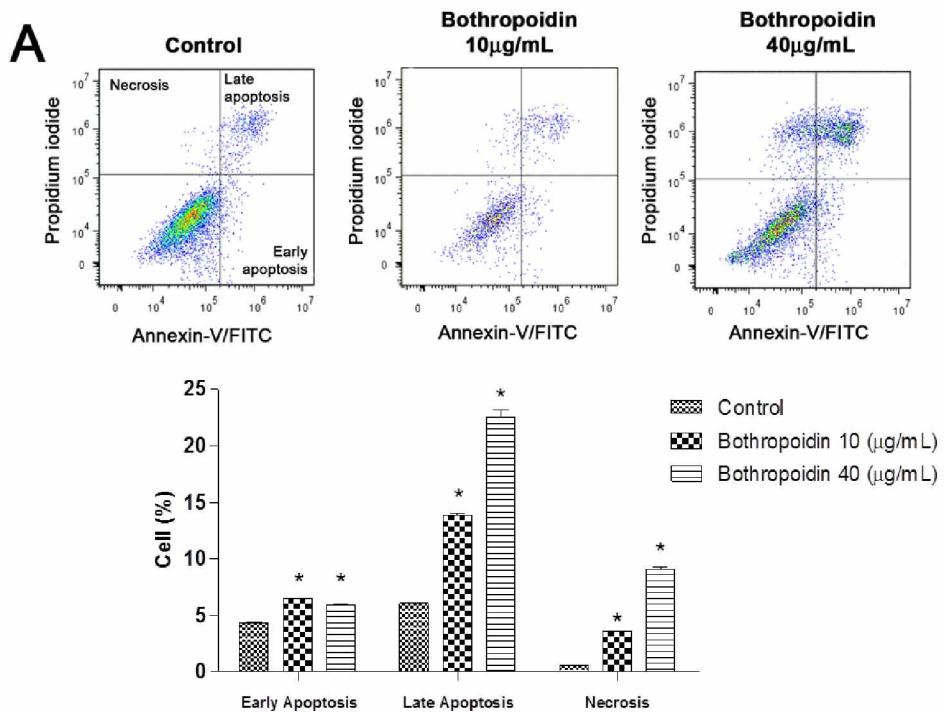
Figure 2.

Figure 3.

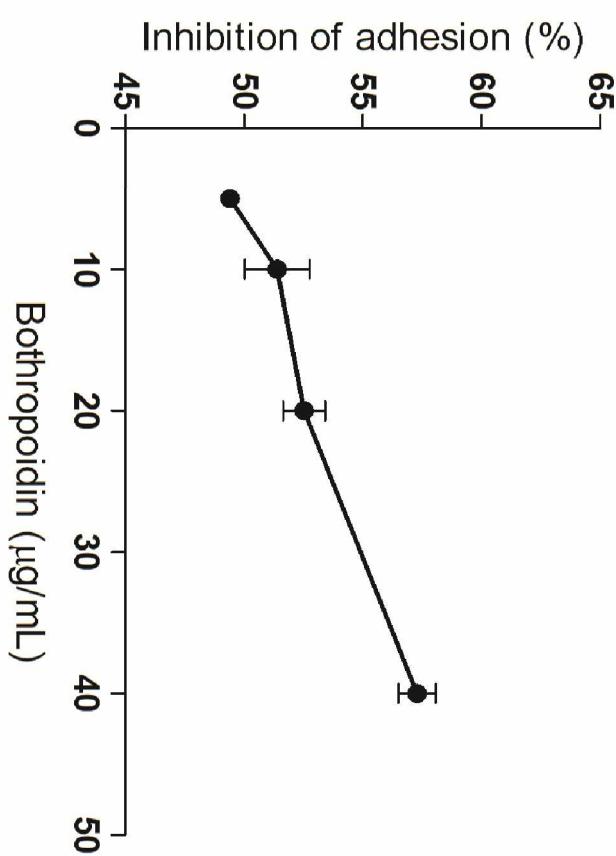


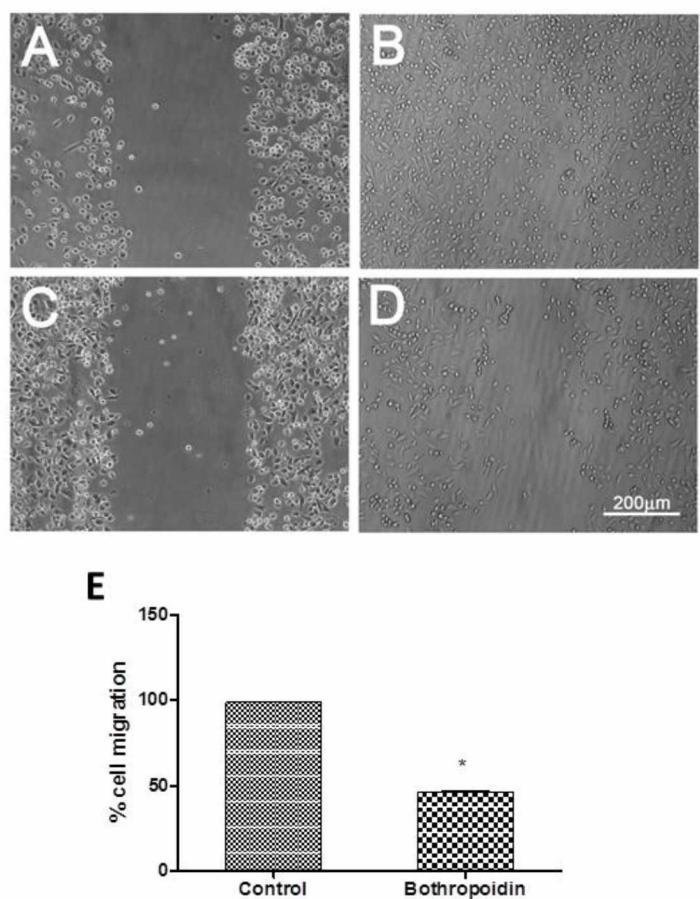
Figure 4.

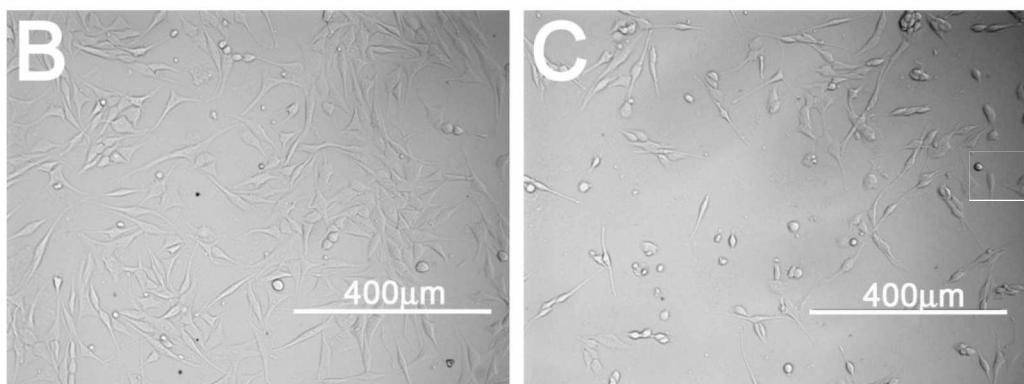
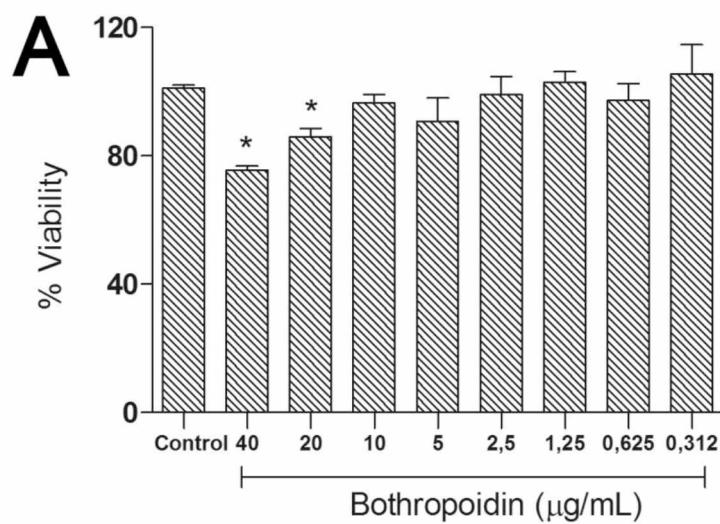
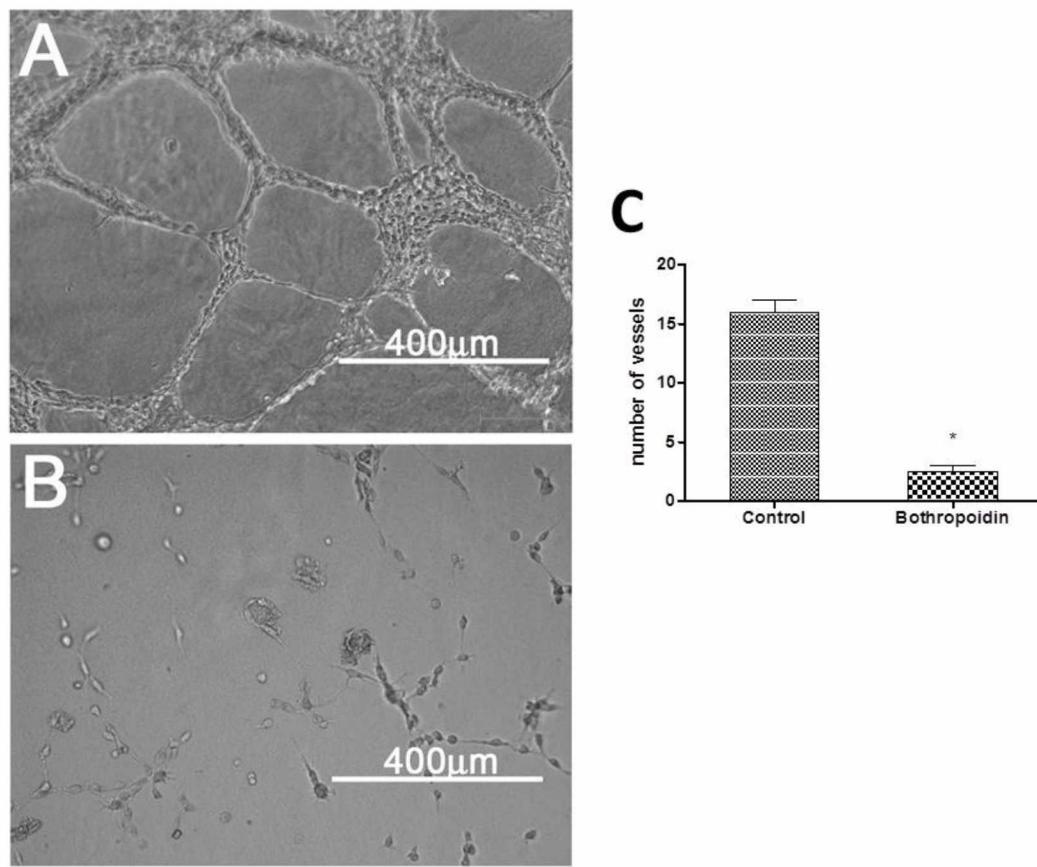
Figure 5.

Figure 6.

References

- [1] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, *Cancer statistics, 2016*, CA: a cancer journal for clinicians 66(1) (2016) 7-30.
- [2] G. Nigenda, M.C. Gonzalez-Robledo, L.M. Gonzalez-Robledo, R.M. Bejarano-Arias, *Breast cancer policy in Latin America: account of achievements and challenges in five countries*, Globalization and Health 12 (2016) 39.
- [3] D. Hanahan, Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*, Cell 144(5) 646-674.
- [4] D. Hanahan, R.A. Weinberg, *The Hallmarks of Cancer*, Cell 100(1) 57-70.
- [5] G.P. Gupta, J. Massague, *Cancer metastasis: building a framework*, Cell 127(4) (2006) 679-95.
- [6] S. Valastyan, R.A. Weinberg, *Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms*, Cell 147(2) (2011) 275-92.
- [7] Y.E. Smith, S.H. Vellanki, A.M. Hopkins, *Dynamic interplay between adhesion surfaces in carcinomas: Cell-cell and cell-matrix crosstalk*, World Journal of Biological Chemistry 7(1) (2016) 64-77.
- [8] P. Devreotes, A.R. Horwitz, *Signaling networks that regulate cell migration*, Cold Spring Harbor perspectives in biology 7(8) (2015) a005959.
- [9] P. Carmeliet, R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*, Nature 407(6801) (2000) 249-257.
- [10] N. Nishida, H. Yano, T. Nishida, T. Kamura, M. Kojiro, *Angiogenesis in Cancer, Vascular Health and Risk Management* 2(3) (2006) 213-9.
- [11] G.W. Prager, M. Poettler, *Angiogenesis in cancer. Basic mechanisms and therapeutic advances*, Hamostaseologie 32(2) (2012) 105-14.
- [12] R. Kerbel, J. Folkman, *Clinical translation of angiogenesis inhibitors*, Nat Rev Cancer 2(10) (2002) 727-739.
- [13] W. Auerbach, R. Auerbach, *Angiogenesis inhibition: a review*, Pharmacology & therapeutics 63(3) (1994) 265-311.

- [14] W. Guo, F.G. Giancotti, Integrin signalling during tumour progression, *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(10) (2004) 816-826.
- [15] Y. Takada, X. Ye, S. Simon, The integrins, *Genome biology* 8(5) (2007) 215.
- [16] J.S. Desgrosellier, D.A. Cheresh, Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities, *Nat Rev Cancer* 10(1) (2010) 9-22.
- [17] G. Serini, D. Valdembri, F. Bussolino, Integrins and angiogenesis: a sticky business, *Experimental cell research* 312(5) (2006) 651-8.
- [18] R. Rathinam, S.K. Alahari, Important role of integrins in the cancer biology, *Cancer metastasis reviews* 29(1) (2010) 223-37.
- [19] S.L. Goodman, M. Picard, Integrins as therapeutic targets, *Trends in Pharmacological Sciences* 33(7) 405-412.
- [20] G.C. Tucker, Integrins: molecular targets in cancer therapy, *Current oncology reports* 8(2) (2006) 96-103.
- [21] M. Paolillo, M.A. Russo, M. Serra, L. Colombo, S. Schinelli, Small molecule integrin antagonists in cancer therapy, *Mini reviews in medicinal chemistry* 9(12) (2009) 1439-46.
- [22] M. Bretschi, M. Merz, D. Komljenovic, M.R. Berger, W. Semmler, T. Bauerle, Cilengitide inhibits metastatic bone colonization in a nude rat model, *Oncology reports* 26(4) (2011) 843-51.
- [23] J.B. Vermorken, J. Guigay, R. Mesia, J.M. Trigo, U. Keilholz, A. Kerber, U. Bethe, M. Picard, T.H. Brummendorf, Phase I/II trial of cilengitide with cetuximab, cisplatin and 5-fluorouracil in recurrent and/or metastatic squamous cell cancer of the head and neck: findings of the phase I part, *British journal of cancer* 104(11) (2011) 1691-6.
- [24] A.J. Saviola, P.D. Burns, A.K. Mukherjee, S.P. Mackessy, The disintegrin tzabcannin inhibits adhesion and migration in melanoma and lung cancer cells, *International journal of biological macromolecules* 88 (2016) 457-64.

- [25] L.A. Calderon, J.C. Sobrinho, K.D. Zaqueo, A.A. de Moura, A.N. Grabner, M.V. Mazzi, S. Marcussi, A. Nomizo, C.F. Fernandes, J.P. Zuliani, B.M. Carvalho, S.L. da Silva, R.G. Stabeli, A.M. Soares, Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy, *Biomed Res Int* 2014 (2014) 203639.
- [26] D.A. Maria, M.G. da Silva, M.C. Correia Junior, I.R. Ruiz, Antiproliferative effect of the jararhagin toxin on B16F10 murine melanoma, *BMC complementary and alternative medicine* 14 (2014) 446.
- [27] M.B. Hammouda, M.F. Montenegro, L. Sanchez-Del-Campo, O. Zakraoui, Z. Aloui, I. Riahi-Chebbi, H. Karoui, J.N. Rodriguez-Lopez, K. Essafi-Benkhadir, Lebein, a Snake Venom Disintegrin, Induces Apoptosis in Human Melanoma Cells, *Toxins* 8(7) (2016).
- [28] J.J. Calvete, The continuing saga of snake venom disintegrins, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 62 (2013) 40-49.
- [29] J. Kim, S.Y. Hong, H.S. Park, D.S. Kim, W. Lee, Structure and function of RGD peptides derived from disintegrin proteins, *Molecules and cells* 19(2) (2005) 205-11.
- [30] S. Niewiarowski, M.A. McLane, M. Kloczewiak, G.J. Stewart, Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors, *Seminars in hematology* 31(4) (1994) 289-300.
- [31] F.S. Markland, Jr., S. Swenson, Snake venom metalloproteinases, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 62 (2013) 3-18.
- [32] A.M. Moura-da-Silva, D. Butera, I. Tanjoni, Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells, *Current pharmaceutical design* 13(28) (2007) 2893-905.
- [33] J.W. Fox, S.M. Serrano, Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity, *FEBS J* 275(12) (2008) 3016-30.
- [34] M.S. Gomes, D.L. Naves de Souza, D.O. Guimaraes, D.S. Lopes, C.C. Mamede, S.N. Gimenes, D.C. Ache, R.S. Rodrigues, K.A. Yoneyama, M.H. Borges, F. de Oliveira, V.M. Rodrigues, Biochemical and functional characterization of

Bothropoidin: the first haemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops pauloensis* snake venom, *Journal of biochemistry* 157(3) (2015) 137-49.

[35] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227(5259) (1970) 680-5.

[36] C.C. Chiu, P.L. Liu, K.J. Huang, H.M. Wang, K.F. Chang, C.K. Chou, F.R. Chang, I.W. Chong, K. Fang, J.S. Chen, H.W. Chang, Y.C. Wu, Goniothalamin inhibits growth of human lung cancer cells through DNA damage, apoptosis, and reduced migration ability, *Journal of agricultural and food chemistry* 59(8) (2011) 4288-93.

[37] C.H. Yeh, H.C. Peng, R.S. Yang, T.F. Huang, Rhodostomin, a snake venom disintegrin, inhibits angiogenesis elicited by basic fibroblast growth factor and suppresses tumor growth by a selective alpha(v)beta(3) blockade of endothelial cells, *Molecular pharmacology* 59(5) (2001) 1333-42.

[38] H.S. Selistre-de-Araujo, C.L.S. Pontes, C.F. Montenegro, A.C.B.M. Martin, Snake Venom Disintegrins and Cell Migration, *Toxins* 2(11) (2010) 2606-2621.

[39] A. Leonardi, T. Sajevic, L. Kovacic, J. Pungercar, M. Lang Balija, B. Halassy, A. Trampus Bakija, I. Krizaj, Hemorrhagin VaH4, a covalent heterodimeric P-III metalloproteinase from *Vipera ammodytes ammodytes* with a potential antitumour activity, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 77 (2014) 141-55.

[40] M.C. Correa, Jr., D.A. Maria, A.M. Moura-da-Silva, K.F. Pizzocaro, I.R. Ruiz, Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 40(6) (2002) 739-48.

[41] L. Gabriel, E. Sanchez, S. Silva, R. Santos, Tumor cytotoxicity of leucurolysin-B, a P-III snake venom metalloproteinase from *Bothrops leucurus*, *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 18 (2012) 24-33.

[42] D.A. Higuchi, M.C. Almeida, C.C. Barros, E.F. Sanchez, P.R. Pesquero, E.A. Lang, M. Samaan, R.C. Araujo, J.B. Pesquero, J.L. Pesquero, Leucurogin, a new recombinant disintegrin cloned from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) with

potent activity upon platelet aggregation and tumor growth, *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology 58(1) (2011) 123-9.

[43] S.H. Kaufmann, W.C. Earnshaw, Induction of apoptosis by cancer chemotherapy, *Experimental cell research* 256(1) (2000) 42-9.

[44] M. Hassan, H. Watari, A. AbuAlmaaty, Y. Ohba, N. Sakuragi, Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer, *BioMed Research International* 2014 (2014) 150845.

[45] I. Tanjoni, R. Weinlich, M.S. Della-Casa, P.B. Clissa, R.F. Saldanha-Gama, M.S. de Freitas, C. Barja-Fidalgo, G.P. Amarante-Mendes, A.M. Moura-da-Silva, Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells, *Apoptosis* 10(4) (2005) 851-61.

[46] S.M. Frisch, H. Francis, Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis, *The Journal of Cell Biology* 124(4) (1994) 619-26.

[47] P. Paoli, E. Giannoni, P. Chiarugi, Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression, *Biochimica et biophysica acta* 1833(12) (2013) 3481-98.

[48] S. Araki, S. Masuda, H. Maeda, M.J. Ying, H. Hayashi, Involvement of specific integrins in apoptosis induced by vascular apoptosis-inducing protein 1, *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology 40(5) (2002) 535-42.

[49] S.M. Albelda, Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 68(1) (1993) 4-17.

[50] M.R. Cominetti, A.C. Martin, J.U. Ribeiro, I. Djaafri, F. Fauvel-Lafeve, M. Crepin, H.S. Selistre-de-Araujo, Inhibition of platelets and tumor cell adhesion by the disintegrin domain of human ADAM9 to collagen I under dynamic flow conditions, *Biochimie* 91(8) (2009) 1045-52.

[51] S. Takeda, H. Takeya, S. Iwanaga, Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins, *Biochimica et biophysica acta* 1824(1) (2012) 164-76.

- [52] M.E. Eichhorn, A. Kleespies, M.K. Angele, K.W. Jauch, C.J. Bruns, Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact, *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie* 392(3) (2007) 371-9.
- [53] C.F. Montenegro, C.L. Salla-Pontes, J.U. Ribeiro, A.Z. Machado, R.F. Ramos, C.C. Figueiredo, V. Morandi, H.S. Selistre-de-Araujo, Blocking alphavbeta3 integrin by a recombinant RGD disintegrin impairs VEGF signaling in endothelial cells, *Biochimie* 94(8) (2012) 1812-20.
- [54] S.E. Lucena, K. Romo, M. Suntravat, E.E. Sanchez, Anti-angiogenic activities of two recombinant disintegrins derived from the Mohave and Prairie rattlesnakes, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 78 (2014) 10-7.
- [55] D.C. Ache, M.S. Gomes, D.L. de Souza, M.A. Silva, M.I. Brandeburgo, K.A. Yoneyama, R.S. Rodrigues, M.H. Borges, D.S. Lopes, V.D. Rodrigues, Biochemical properties of a new PI SVMP from *Bothrops pauloensis*: Inhibition of cell adhesion and angiogenesis, *International journal of biological macromolecules* 72C (2014) 445-453.
- [56] A.M. Moura-da-Silva, C. Baldo, Jararhagin, a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from *Bothrops jararaca*, *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 60(3) (2012) 280-9.