



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
Pós-graduação em Genética e Bioquímica**

Efeito antitumoral e antiangiogênico de uma fosfolipase  $A_2$  da peçonha de *Bothrops jararacussu* (BthTX-II) e inibição da Transição Epitélio-Mesênquima (EMT) sob células tumorais de mama

MSc. Fernanda Van Petten de Vasconcelos Azevedo

Orientadora: Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Co-orientadora: Dra. Lara Vecchi

Uberlândia-MG

2019



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
Pós-graduação em Genética e Bioquímica**

Efeito antitumoral e antiangiogênico de uma fosfolipase A<sub>2</sub> da peçonha de *Bothrops jararacussu* (BthTX-II) e inibição da Transição Epitélio-Mesênquima (EMT) sob células tumorais de mama

MSc. Fernanda Van Petten de Vasconcelos Azevedo

Orientadora: Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Co-orientadora: Dra. Lara Vecchi

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética e Bioquímica (subárea: Bioquímica).

**Uberlândia-MG**

2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

A994  
2019 Azevedo, Fernanda Van Petten de Vasconcelos, 1980-  
Efeito antitumoral de uma fosfolipase A2 da peçonha de  
Bothrops jararacussu (BthTX-II) e inibição da Transição  
Epitélio-Mesênquima (EMT) sob células tumorais de mama  
[recurso eletrônico] / Fernanda Van Petten de Vasconcelos  
Azevedo. - 2019.

Orientadora: Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.  
Coorientadora: Dra. Lara Vecchi.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Pós-graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te>.

2019.2091  
Inclui bibliografia.  
Inclui ilustrações.

1. Genética. I. de Melo Rodrigues Ávila, Dra. Veridiana ,  
1971-, (Orient.). II. Vecchi, Dra. Lara, 1981-, (Coorient.). III.  
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em  
Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

## ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico - nº 04/2019 - PPGGB				
Data:	Dezenove de julho de 2019	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	18:45
Matrícula do Discente:	11523GBI008				
Nome do Discente:	Fernanda Van Petten de Vasconcelos Azevedo				
Título do Trabalho:	Efeito antitumoral, antiangiogênico e inibição da Transição Epitélio-Mesênquima (EMT) sob células tumorais de mama de uma fosfolipase A <sub>2</sub> da peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i> (BthTX-II).				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Estrutura e Função de Proteínas.				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Ação antiangiogênica e antimetastática de uma fosfolipase A <sub>2</sub> de peçonha ofídica em câncer de mama: uma abordagem <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> .				

Aos dezoito dias do mês de julho de dois mil e dezoito, às 14:00 horas no Anfiteatro 4K, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daiana Silva Lopes, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Gobbi Amorim, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vivian Alonso Goulart, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Santos Rodrigues e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o (a) candidato (a): APROVADA. Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Veridiana de Melo Rodrigues Avila, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/07/2019, às 18:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Alonso Goulart, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/07/2019, às 18:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Renata Santos Rodrigues, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/07/2019, às 18:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Daiana Silva Lopes, Usuário Externo**, em 19/07/2019, às 18:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Gobbi Amorim, Usuário Externo**, em 19/07/2019, às 18:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1367963** e o código CRC **949F88AA**.

---



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
Pós-graduação em Genética e Bioquímica**

Efeito antitumoral e antiangiogênico de uma fosfolipase  $A_2$  da peçonha de *Bothrops jararacussu* (BthTX-II) e inibição da Transição Epitélio-Mesênquima (EMT) sob células tumorais de mama

**MSc. Fernanda Van Petten de Vasconcelos Azevedo**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila (Orientador)

**Examinadores:** Profa. Dra. Vivian Alonso Garcia Goulart

Profa. Dra. Daiana Silva Lopes

Profa. Dra. Fernanda Amorim

Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues

**Data da Defesa: 19/07/2019**

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Tese foram contempladas.

---

**Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila**

## *Dedicatória*

---

Ao meu amado Jesus que me conquistou e até aqui foi meu sustento.

A Ele toda honra, glória e louvor.

*“Rendam graças ao Senhor, pois ele é bom e seu amor dura para sempre  
(1 Crônicas 16:34) ”.*

Dedico essa vitória a aqueles que sempre me apoiaram incondicionalmente, que torceram por mim mais do que ninguém e que seguramente são os que mais compartilham da minha alegria. Minha família: Amo vocês!!

- ♦ Ao meu **PAI** e à minha **MÃE**, pelo amor incondicional, pela sólida formação dada até à minha juventude, que me proporcionou a continuidade nos estudos até à chegada a este doutorado. O meu amor e eterno obrigado.
- ♦ Ao meu marido **Mauro Azevedo** e aos meus queridos e preciosos filhos “**Pedro e Maria Tereza**”, que muitas vezes foram sacrificados para que eu conseguisse chegar até aqui, que souberam compreender meus momentos de ausência e cansaço. Agradeço todo o amor, carinho, admiração, e pela presença incansável com que me apoiaram ao longo de todo esse período.

## *Agradecimentos*

---

*“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.  
Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”  
Antoine de Saint-Exupéry*

Nestes quatro anos em que me dediquei a essa pesquisa, foi uma árdua jornada, com desafios, construção e amadurecimento pessoal e profissional. É sabido que nenhuma conquista ou empreendimento, é realizado de forma fácil e sem esforço, pois o verdadeiro espírito de um herói, se encontra na intensa convicção de enfrentar e vencer as dificuldades em vez de desistir de tudo.

Por esse motivo, gostaria de expressar toda minha gratidão e apreço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta tarefa se tornasse uma realidade, e pelo qual a elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. A todos vocês, os meus sinceros agradecimentos

Agradeço a amiga e orientadora, Professora Dra. **Veridiana de Melo Rodrigues Ávila**, para quem não há agradecimentos que cheguem. As notas dominantes da sua orientação e a cordialidade com que sempre me recebeu, foram a alavanca e o gatilho necessário para meu aprimoramento, na qual suas dúvidas e desafios, sempre me impulsionaram a novas descobertas. Estou grata por ambas e também pela liberdade de ação que me permitiu e foi decisiva para que este trabalho contribuísse para o meu desenvolvimento pessoal. Como professora foi o expoente máximo, abriu-me horizontes, ensinou-me principalmente a pensar. Foi, e é fundamental na transmissão de experiências, na criação e solidificação de saberes e nos meus pequenos sucessos. Como amiga, sempre nas palavras encorajadoras, nos elogios, por está sempre ao nosso lado sem precisarmos pedir o que quer que seja. Obrigada!

Ao professor Dr. **Luiz Ricardo Goulart**, coordenador do laboratório de nanobiotecnologia, responsável por gerenciar e formar inúmeras pessoas com habilidades e personalidades diferentes. A sua disponibilidade irrestrita, a sua forma exigente, crítica e criativa de arguir as ideias apresentadas, aos desafios propostos, as apresentações de última hora, facilitaram o alcance dos objetivos propostos nesta tese, me instigaram a



querer e conhecer sempre mais. Muito obrigada pela oportunidade oferecida e pela confiança em mim depositada!!

Aos funcionários do Instituto de Biotecnologia e da pós-graduação em Genética e Bioquímica (Madson, Ismair, Janaína, Sr. Paulo, Tianinha, Marina), pela amabilidade e colaboração prestada sempre que solicitada, pelos bons dias diários, transmitidos com muita alegria e sorriso no rosto.

Manifesto aqui minha gratidão a todos os professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica e do Instituto de Biotecnologia (UFU), pela transmissão do conhecimento e atenção. Pelos órgãos de fomentos que custearam meus estudos e tornaram essa árdua tarefa mais fácil (CAPES, CNPq, FAPEMIG).

Aos animais utilizados neste trabalho, estes que cederam a vida para o conhecimento e entendimento das doenças e que por eles a pesquisa pudesse ser concluída. Cabe a nós da ciência, em todo o momento sermos gratos e honrados, e executar nosso trabalho com todo o respeito que eles merecem.

As professoras que sempre estiveram presentes, nos conselhos, sempre com uma palavra de ânimo e estímulo e muitas vezes também me socorrendo nos reagentes que faltavam, Thaise Araújo, Yara Paiva, Bia Fonseca, Kelly Yoneyama, Cássia Regina, o meu eterno obrigado.

A professora Dra. Renata Santos Rodrigues, pelos momentos divididos, por ser essa grande profissional e acima de tudo, por ser uma grande amiga! Obrigada por tudo.

A minha co-orientadora, Lara Vecchi, pelas idéias, oportunidades, sorrisos, por sempre respeitar minhas opiniões e se fazer presente em todos os momentos decisivos. Obrigada por tudo!

Aos meus amigos de laboratório, que nunca estiveram ausentes, agradeço a amizade, o carinho, as palavras de estímulo e aos cafezinhos que sempre nos animaram, principalmente nos momentos de cansaço mental. Muita gratidão!!! (Antonieie “Toninha”, Sarah Gimenes, Sara “Sareta”, Vitor Freitas, Aline Teodoro, Maria Júlia, Gabis, Jéssica “Formiguinha”, Douglas, Ana Flávia, Tafarel, Emília, Anielle, Mônica, Isabela, Fabiana, Patrícia Terra, Luana, Marininha, David, José Neto, Ester, Paula Santos,

Tales, Tássia, Sâmila, Thiago, Samuel, Ana Cecília). Isso é prova que muitas amizades começam nesses momentos, cada um com seu jeitinho especial de ser.

Deixo aqui alguns agradecimentos especiais. Aos meus amigos de todas as horas nessa longa jornada, alguns desde o início da minha caminhada acadêmica, outros nem tanto, mas cuja proximidade é tanta que nem me lembro mais como ou quando começou. A minha amiga e colaboradora em muitos trabalhos na UFU e nas parcerias da vida, **Mariana Alves Pereira Zóia**, por estar sempre presente, pelos sorrisos, incentivos diários e por compartilhar comigo ambições de um futuro melhor. A minha amiga, orientadora nas horas vagas, companheira em muitas dúvidas, discussões e comemorações, **Daiana Silva Lopes**, por estar sempre disponível nos meus desesperos acadêmicos, mesmo distante fisicamente se tornou presente, por me ouvir e entender o meu lado, o meu eterno obrigado. E por último e não menos importante aos meus amigos **Lucas Ian Veloso, Jéssica Rodrigues, Denise O. Guimarães e Lorena Polloni**, pelos estímulos, pelas constantes colaborações na vida e na pesquisa, pela confiança, por estarem sempre presentes, por ajudarem e me encorajarem a seguir em frente. Vocês são especiais.

Meus respeitosos agradecimentos pela contribuição da banca no exame de qualificação e também pela participação dos membros na banca examinadora da defesa, Dr. Marcelo Silva, Dr. Edgar Silveira, Dra. Vivian Alonso Goulart, Dra. Daiana Silva Lopes, Dra. Renata Santos Rodrigues, Dra. Fernanda Amorim.

Meu muito obrigada a quem me encoraja todos os dias em todos os aspectos da minha vida, minha família em BH, aos meus irmãos (Giselle/Felipe e Thiago/Nara), aos meus queridos sobrinhos, a família Azevedo que sempre esteve muito presente na minha vida, a igreja de Cristo, que se tornou uma extensão da família, grata, pelas orações e amizade.

Mais uma etapa foi vencida. A todos muito obrigada por possibilitarem que esse sonho se tornasse realidade.

“Procuro semear otimismo e plantar sementes de paz e justiça. Digo o que penso, com esperança. Penso no que faço, com fé. Faço o que devo fazer, com amor. Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também se aprende. Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir”.

**Cora Coralina**

## *Lista de Figuras, Quadros e Tabela*

---

FIGURA 1: NÚMERO TOTAL DE PESSOAS COM CANCER. ....	21
FIGURA 2: PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS QUE DIFEREM UMA CÉLULA COM CÂNCER DE UMA CÉLULA NORMAL. FONTE: ADAPTADO DE HANAHAN E WEINBERG (2000), “THE HALLMARKS OF CANCER”; .....	23
FIGURA 3: TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA (EMT) E PLASTICIDADE DAS CÉLULAS EPITELIAIS. DURANTE A (EMT).....	26
FIGURA 4: AÇÃO CITOTÓXICA E MORTE CELULAR INDUZIDA PELA BTHTX-II SOBRE CÉLULAS MDA-MB-231.....	71
FIGURA 5: EFEITO DA BTHTX-II NA PROLIFERAÇÃO CELULAR E PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS MDA-MB-231 .....	74
FIGURA 6: EFEITO DA BTHTX-II NA ADESÃO CELULAR, MIGRAÇÃO, INVASÃO E CRESCIMENTO 3D DE CÉLULAS MDA-MB-231 .....	77
FIGURA 7: EFEITO DA BTHTX-II SOBRE A EXPRESSÃO DE INTEGRINAS.....	79
FIGURA 8: EFEITO DA BTHTX-II NA EXPRESSÃO DOS MARCADORES EMT DE CÉLULAS MDA-MB-231. ....	81
FIGURA 9: ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DE VIMENTINA E E-CADERINA APÓS TRATAMENTO BTHTX-II (10 E 50 µG/ML) SOBRE CÉLULAS MDA-MB-231 ESTIMULADAS COM EGF.....	82
FIGURA 10: INIBIÇÃO ADESÃO E MIGRAÇÃO .....	84
FIGURA 11: INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE VASOS <i>IN VITRO</i> PELA BTHTX-II EM CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS (HUVEC).....	86
FIGURA 12: INIBIÇÃO DA ANGIOGÊNESE PELO MODELO <i>EX VIVO</i> (AORTIC RING ASSAY).. ..	87
FIGURA 13: COLORAÇÃO POR IMUNOFLORESCÊNCIA DA ANGIOGÊNESE INDUZIDA NO MODELO DO ANEL AÓRTICO. IMAGENS DE MARCAÇÃO FLUORESCENTE DE MICROVASOS INDUZIDOS POR FATOR DE CRESCIMENTO EM MATRIGEL. ....	88
FIGURA 14: ANGIOGÊNESE TUMORAL, CO-CULTURA HUVEC/MDA-MB-231:.....	90
FIGURA 15: INIBIÇÃO DA INVASÃO EM CO-CULTURA DE CÉLULAS TRATADAS COM BTHTX-II.. ..	92
FIGURA 16: ANGIOGÊNESE TUMORAL <i>IN VIVO</i> , METODO CAM.....	94

FIGURA 17: DIFERENTES EFEITOS DA BTHTX-II SOBRE VIAS DE SINALIZAÇÃO. MODELO REPRESENTATIVO DOS EFEITOS ANTIMETASTÁTICOS E ANTITUMORAIS DA BTHTX-II EM UMA CÉLULA DE CÂNCER DE MAMA HUMANA (MDA-MB-231).....	104
QUADRO 1: DIFERENÇAS MOLECULARES E CELULARES ENTRE CÉLULAS EPITELIAIS E MESENQUIMAIS.....	27
TABELA 1: SUPERFAMÍLIA DE PLA <sub>2</sub> .....	44

## *Lista de abreviaturas e Siglas*

---

**AA** Ácido araquidônico

**Asp49-PLA2** Fosfolipases A2 catalíticas que possuem um resíduo de ácido aspártico na posição 49

**bFGF** Fator de crescimento básico de fibroblasto

**BthTX-II** Bothropstoxina II de *Bothrops jararacussu*

**CDI** carcinoma ductal invasivo

**CKS** citoqueratinas

**EGFR** receptor do fator de crescimento epidérmico

**EORTC** European Organisation for Research and Treatment of Cancer

**GLOBOCAN** Agência Internacional de Pesquisa com Câncer

**HER2** receptor do fator 2 de crescimento epidermal humano

**HCL** Ácido clorídrico

**INCA** Instituto Nacional de Câncer – INCA

**INGEB** Instituto de Genética e Bioquímica

**NIH** National Institutes of Health

**OMS** Organização Mundial da Saúde

**PBS** Tampão fosfato-salino

**PBST** Tampão fosfato salino com Tween-20

**PCR** Reação em cadeia da polimerase

**PECAM-1** Molécula de adesão celular endotelial plaquetária

**PLA<sub>2</sub>** Fosfolipase A<sub>2</sub>

**RE** Receptores de estrógeno

**RH** Receptor hormonal

**RP** Receptor progesterona

**RT-PCR** Reverse transcription polymerase chain reaction

**TGFbeta** Fator de transformação do crescimento

**TNBC** Triple negative breast câncer (Câncer de mama triplo negativo)

**TWIST** Fator básico de transcrição codificado em humano pelo gene *TWIST1*

**VEGFR** Receptor do fator de crescimento endotelial vascular

**WHO** World Health Organization (Organização mundial da saúde)

## *Sumário*

---

Abstract.....	xvi
Resumo .....	xvii
1. Introdução.....	19
1.1. História do câncer .....	19
1.2. Câncer: Biologia dos Tumores.....	20
1.1.1. Aspectos Epidemiológicos e carcinogênicos .....	20
1.3. Células epiteliais, endoteliais e mesenquimais .....	24
1.1.2. Transição epitélio-mesenquimal (EMT) no Câncer.....	25
1.4. Angiogênese e Metástase tumoral .....	29
1.5. Resistência aos principais processos de morte celular pelas células tumorais	33
1.1.3. Apoptose e Necrose .....	33
1.1.4. Autofagia.....	35
2. Câncer de Mama.....	36
3. Classificação, característica e função das fosfolipases A <sub>2</sub> .....	42
4. Fosfolipases A <sub>2</sub> de peçonha de serpentes (svPLA <sub>2</sub> ).....	46
5. Objetivos .....	49
5.1. Objetivo Geral.....	49
5.2. Objetivos Específicos.....	49
6. Metodologia .....	51
6.1. Peçonha:.....	51
6.2. Purificação da fosfolipase A <sub>2</sub> Asp-49-BthTX-II.....	51
6.3. Dosagem Proteica .....	51
6.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE)	52
.....	52
6.5. Animais .....	53
6.6. Cultura de células.....	53
6.7. Ensaio de citotoxicidade por MTT .....	54
6.8. Ensaio de Apoptose com Anexina V / Iodeto de Propídeo.....	54
6.9. Expressão gênica pelo método de PCR em tempo real (RT-PCR).....	55
6.10. Ensaio de migração pela técnica de cicatrização da ferida “Wound healing” .	56
6.11. Ensaio de Inibição da adesão celular .....	57



6.12.	Ensaio de migração celular em <i>Transwell</i> .....	58
6.13.	Ensaio de Invasão celular.....	58
6.14.	Ensaio tridimensional (3D) em Matrigel – formação de esferóides .....	59
6.15.	Ensaio de Proliferação Celular.....	59
6.16.	Ensaio de citotoxicidade por LDH.....	60
6.17.	Ensaio de autofagia .....	60
6.18.	Análise do ciclo celular.....	61
6.19.	Western blotting.....	62
6.20.	Expressão de Integrinas em células .....	62
6.21.	Ensaio de formação de vasos em células HUVEC (Angiogênese <i>in vitro</i> ).....	63
6.22.	Dosagem de VEGF no sobrenadante de células HUVEC .....	63
6.23.	Ensaio de anel aórtico – modelo de angiogênese <i>ex vivo</i> .....	64
6.24.	Co-cultura de células endoteliais humanas (HUVEC) e células de câncer mama (MDA-MB-231).....	64
6.25.	Crescimento e angiogênese tumoral <i>in vivo</i> pelo método de <i>Chick Chorioallantoic Membrane</i> (CAM) .....	65
6.26.	Estatística.....	66
7.	Resultados .....	67
7.1.	Isolamento da PLA <sub>2</sub> Asp49- BthTX-II .....	67
8.	Efeito antitumoral da BthTX-II.....	69
8.1.	BthTX-II induz morte celular em células de câncer de mama.....	69
8.2.	BthTX-II inibe a proliferação celular e promove a parada do ciclo celular na fase G2/M .....	72
9.	Efeito antimetastático da BthTX-II.....	75
9.1.	BthTX-II interfere na adesão, migração, invasão e no crescimento de esferóides celulares (3D) de células MDA-MB-231 .....	75
9.2.	BthTX-II modula a expressão de integrinas envolvidas com o processo de angiogênese tumoral.....	78
9.3.	BhTX-II modula a expressão de marcadores epiteliais e mesenquimais em células MDA-MB-231. ....	79
10.	Efeito antiangiogênico da BthTX-II.....	83
10.1.	BThTX-II interfere na adesão e migração de células HUVEC.....	83
10.2.	BthTX-II inibe a formação de vasos e diminui a produção do fator de crescimento endotelial (VEGF) (modelo <i>in vitro</i> ) .....	85

10.3. BthTX-II inibe a formação de vasos através do anel de aorta de camundongos (modelo <i>ex vivo</i> ).....	87
10.4. BthTX-II inibe a angiogênese tumoral pelo ensaio de co-cultura de células MDA-MB-231 e HUVEC .....	89
10.5. BThTX-II inibe a invasão em co-cultura de células MDA-MB-231: HUVEC. ....	91
10.6. BthTX-II inibe a angiogênese tumoral <i>in vivo</i> , através do ensaio <i>Chick Chorioallantoic Membrane</i> (CAM). ....	93
11. Discussão .....	95
12. Conclusão .....	110
Referências .....	112

## **Abstract**

Phospholipases A2 represent an enzyme superfamily widely distributed in living organisms, with a broad spectrum of pharmacological activities and therapeutic potential. In this context, the present paper reports firsthand the antitumor, antimetastatic and antiangiogenic effects of BthTX-II, a PLA2 Asp49 isolated from *Bothrops jararacussu* venom, on breast cancer strains. BthTX-II induced cell death by modulating different genes of the intrinsic (BAD, BAX, BCL2 and BCL2L1) and extrinsic (TNF, TNFRS10B, TNFRSF1A and Caspase 8) signaling pathways. PLA2 also inhibited cell proliferation, adhesion, migration, cell invasion and 3D growth in matrigel, reducing the aggressiveness of metastatic breast cancer cells by negatively modulating the BRCA1 and BRCA2 tumor suppression genes, as well as the proangiogenic factor. ANGPT1. In addition, BthTX-II reduced the expression of vimentin, TWIST1, CK-5 and was able to increase the protein expression of E-cadherin and its gene (CDH-1), leading the metastatic breast cancer cell to assume a characteristic epithelial phenotype with less invasive properties. Interestingly, BthTX-II inhibited human endothelial cell adhesion, invasion and migration and blocked angiogenesis by decreasing the formation of new vessels in HUVEC cells (in vitro) and the formation of cell extensions in an ex vivo aortic fragment model, as well as reducing production of endothelial growth factor (VEGF). In addition, it demonstrated action on growth in co-culture, whose action was the reduction of tumor mass in vivo in the membrane assay (CAM) in chicken embryos. Taken together, the results show that BthTX-II has significant antitumor and antiangiogenic activity, enabling its use as a potential prototype for the development of antitumor drugs in triple negative breast cancer therapy.

**Keywords:** BthTX-II, Breast Cancer, Angiogenesis, PLA2-Asp-49, EMT

## Resumo

As fosfolipases A<sub>2</sub> representam uma superfamília de enzimas amplamente distribuída nos organismos vivos, com um amplo espectro de atividades farmacológicas e potencial terapêutico. Nesse contexto, o presente trabalho relata em primeira mão os efeitos antitumorais, antimetastáticos e antiangiogênicos da BthTX-II, uma PLA<sub>2</sub> Asp49 isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*, sobre linhagens de câncer de mama. A BthTX-II induziu morte celular através da modulação de diferentes genes das vias de sinalização intrínseca (*BAD*, *BAX*, *BCL2* e *BCL2L1*) e extrínseca (*TNF*, *TNFRSF10B*, *TNFRSF1A* e *Caspase 8*) da apoptose. A PLA<sub>2</sub> também inibiu a proliferação celular, adesão, migração, invasão celular e crescimento 3D em matrigel, reduzindo a agressividade das células câncer de mama metastático, através da modulação negativa dos genes de supressão tumoral *BRCA1* e *BRCA2*, bem como do fator pró-angiogênico *ANGPT1*. Além disso, a BthTX-II reduziu a expressão de vimentina, *TWIST1*, CK-5 e foi capaz aumentar a expressão proteica de E-caderina e também do seu gene (*CDH-1*), levando a célula câncer de mama metastático a assumir um fenótipo característico epitelial, com propriedades menos invasivas. Interessantemente, a BthTX-II inibiu a adesão, invasão e migração de células endoteliais humanas e bloqueou a angiogênese por diminuir a formação de novos vasos em células HUVEC (*in vitro*) e formação de prolongamentos celulares em modelo *ex vivo* de fragmento de aorta, além de reduzir a produção de fator de crescimento endotelial (VEGF). Em adição demonstrou ação sobre crescimento em co-cultura, cuja ação foi a redução da massa tumoral *in vivo* no ensaio de membrana (CAM) em embriões de galinhas. Analisados em conjunto, os resultados demonstram que a BthTX-II apresenta significativa atividade antitumoral e antiangiogênica, possibilitando o seu uso como um protótipo potencial para o desenvolvimento de fármacos antitumorais na terapia contra o câncer de mama triplo negativo.

**Palavras chaves:** BthTX-II, Câncer de Mama, Angiogênese, PLA<sub>2</sub>-Asp-49, Fosfolipase A<sub>2</sub>, EMT

## *Introdução*

---

# 1. Introdução

## 1.1. História do câncer

A história do câncer apresenta registros milenares que datam de aproximadamente 2.500 anos, apesar de ser uma doença predominantemente associada aos tempos modernos. Em todas as regiões do mundo, registros mais antigos compartilham sempre a mesma informação de se tratar de uma doença predominantemente incurável (Saito, 2016; Teixeira et al., 2007).

Durante muito tempo quase nada se sabia sobre essa doença, e era praticamente nula a capacidade dos médicos em diagnosticar, evitar o sofrimento e as mortes que ela acarretava. No entanto, o câncer era pouco percebido na sociedade, e a existência desses registros e fatos que foram se perdendo devido as diferentes epidemias e pandemias causadas por agentes infecciosos que dominavam o antigo mundo sendo responsáveis por dizimar inúmeras cidades, vilas ou povoados, numa época em que os antibióticos não eram ainda conhecidos (Teixeira et al., 2007).

Os registros feitos por Egípcios, Persas e Indianos, no século 30 antes de Cristo, já relatavam sobre a história de tumores malignos que infringiam um rol de mazelas, sofrimento e morte. Entretanto, só com os estudos da escola hipocrática grega, datados do século IV a. C., é que a doença foi mais bem definida e caracterizada como um tumor duro que, muitas vezes, reaparecia tempos depois de ser extraído, ou que se alastrava para diversas partes do corpo levando à morte, sendo denominado de “carcicoma ou cirro”. Os estudiosos hipocráticos viam essa doença como um desequilíbrio dos fluidos que compunham o organismo e essa noção manteve-se presente na medicina ocidental até o século XVII, sendo que, a partir do século XV, a descoberta do sistema linfático fez com que a doença fosse relacionada ao desequilíbrio da linfa nos organismos, e apenas no século XIX, com o desenvolvimento da teoria celular, a partir dos trabalhos de Virchow

(1821-1902), finalmente possibilitou a vinculação da doença às células e a seu processo de divisão (Gomes, 2014; Saito, 2016; Teixeira et al., 2007).

## **1.2. Câncer: Biologia dos Tumores**

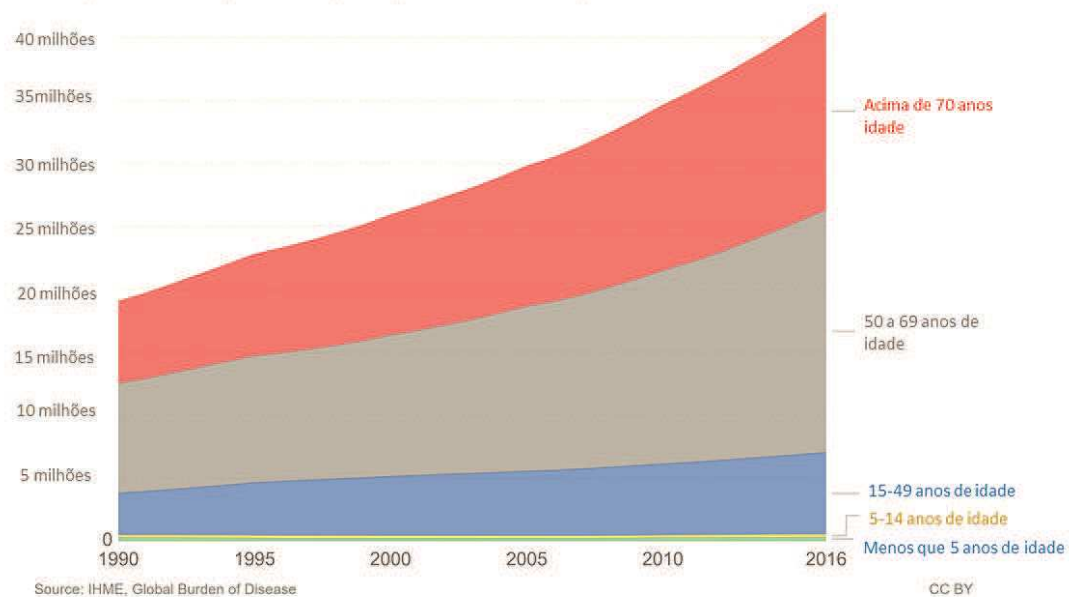
### **1.1.1. Aspectos Epidemiológicos e carcinogênicos**

O câncer é considerado como um problema de saúde pública devido a alta incidência, prevalência, mortalidade e principalmente aos elevados custos hospitalares durante o tratamento. Segundo estimativas publicadas pela Agência Internacional de Pesquisa com Câncer (GLOBOCAN), dados mundiais de setembro de 2018 sugerem um aumento expressivo na carga global de câncer, foram registrados 18,1 milhões de casos, sendo que destes casos, 9,5 milhões foram diagnosticados em homens e 8,5 milhões em mulheres, acarretando em 9,6 milhões de mortes por câncer, contra os 6 milhões registrados no ano de 2016. A Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer-IARC (Globocan, 2019), estima que um em cada cinco homens e uma a cada seis mulheres em todo o mundo desenvolvam câncer ao longo de sua vida, e que um a cada oito homens e uma a cada onze mulheres morrerão dessa doença (Bray F, 2018).

Com a melhora do saneamento básico nas cidades, políticas públicas de prevenção, a expectativa de vida das pessoas aumentou além dos 75 anos de idade nos dias atuais, principalmente nos países mais desenvolvidos. Somando o aumento da longevidade a outros fatores, como obesidade, tabagismo, produtos químicos, físicos, alterações genéticas e fenotípicas, estima-se que a incidência de câncer continue em ascensão, como demonstra a curva de crescimento durante o período de 1999 a 2016 apresentada na Figura 1 (Teixeira *et al.*, 2007; Library, 2015; Saito, 2016; Ritchie, 2018; Who, 2018; Globocan, 2019).

## Número de pessoas com câncer por idade no mundo.

Número de pessoas com câncer, diferenciado por idade, mensurado em todos tipos de câncer



**FIGURA 1: NÚMERO TOTAL DE PESSOAS COM CANCER.** Classificação por idade em todo o mundo, nos últimos 30 anos. Retirado de [ourworldindata.org/cancer](http://ourworldindata.org/cancer)

FONTE: traduzido (RITCHIE, 2018).

O corpo humano funciona como se fosse uma sociedade, na qual as células são consideradas integrantes principais que se reproduzem através de divisões celulares e organizam-se em conjuntos (tecidos) que colaboram entre si. Assim, para coordenarem este comportamento as células enviam, recebem e interpretam um conjunto sofisticado de sinais. Cada célula comporta-se de uma maneira, podendo se dividir, diferenciar ou morrer. Qualquer alteração molecular que perturbe este comportamento harmonioso pode resultar em problemas para o organismo. Neste contexto, as células cancerosas violam as regras mais básicas de comportamento pelo qual os organismos são construídos e mantidos (Alberts, 2010; Bianconi *et al.*, 2013).

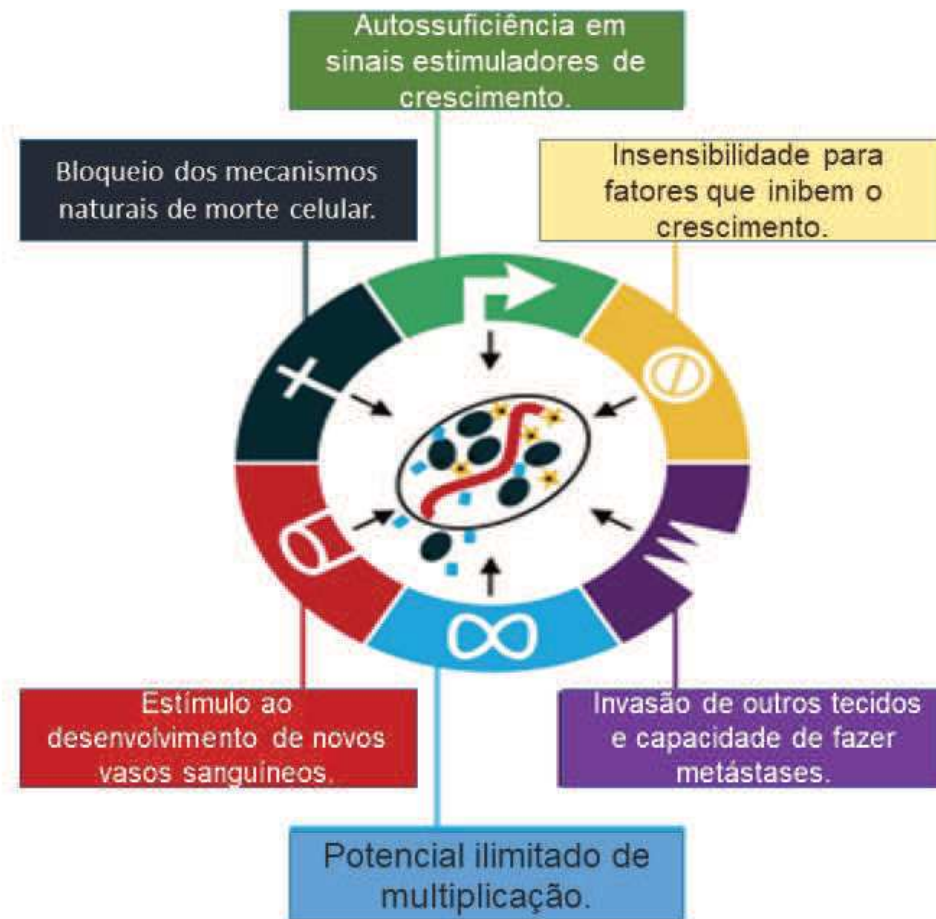
O surgimento do câncer (Tumorigênese) é um processo de múltiplos passos que ocorrem mediante mudanças genéticas discretas que transformam as células normais em células malignas. O DNA cujas moléculas contêm as instruções genéticas de todas as



células possuem genes com capacidade de controlar o crescimento e a divisão das células, sendo os genes que promovem essa divisão celular chamados de oncogenes, e os genes que retardam a divisão celular ou levam as células à morte no momento certo de genes supressores do tumor, dentre eles, os mais importantes *BRCA1 e 2*, *P53*, *ATM*, *CHEK-2* e *PTEN* (Hanahan e Weinberg, 2000).

Existem mais de 200 tipos diferentes de cânceres e essa doença pode ter origem em qualquer órgão do corpo. Os tumores são classificados de acordo com o tecido ou tipo celular ao qual foi derivado como o tecido epitelial, tecido conjuntivo, glandular ou tecido muscular. Tumores originados de células epiteliais são considerados os mais comuns entre os seres humanos, sendo denominados de carcinoma. Quando derivados do tecido conectivo ou muscular são chamados de sarcoma, além dos tipos cancerígenos, linfomas e leucemias, que se desenvolvem a partir de células da linhagem branca ou precursores (células hematopoiético), e também os cânceres do Sistema Nervoso Central e Medula Espinhal (Inca, 2014).

As células cancerígenas apresentam propriedades diferenciadas em relação às células normais, entre elas encontram-se a capacidade anormal de divisão celular, sustentação de sinalização proliferativa, evasão da ação de supressores de crescimento tumoral, resistência à morte celular, a angiogênese, invasão, progressão tumoral e por fim, a metástase tumoral (Hanahan e Weinberg, 2000; 2011). A figura 2 descreve os seis principais marcadores tumorais conhecidos também como Marcadores do Câncer (*Hallmarks of câncer*).



**FIGURA 2:** Principais características que diferem uma célula com câncer de uma célula normal.  
**FONTE:** Adaptado de HANAHAN E WEINBERG (2000), “THE HALLMARKS OF CANCER”;

Como último passo dessa progressão tumoral, a metástase é um processo de disseminação do tumor inicial por meio de várias etapas. As células tumorais se disseminam de seu sítio primário, formam tumores secundários em um local distante oriundos das etapas de invasão local, intravasamento, transporte, extravasamento e colonização. Além disso, existe um processo denominado transição epitelial-mesenquimal (EMT) que demonstrou desempenhar um papel crítico na promoção de metástase em carcinoma derivado de epitélio (Kalluri e Neilson, 2003; Lee *et al.*, 2006; Sarrio *et al.*, 2008; Rajabi e Mousa, 2017).

### 1.3. Células epiteliais, endoteliais e mesenquimais

O tecido epitelial se caracteriza pela presença de células justapostas com pouca matriz extracelular entre eles. Apresenta funções de revestimento de superfícies, absorção de moléculas, percepção de estímulos, contração e secreção. Para que essas funções sejam exercidas são necessários a presença das lâminas e membranas basais que fazem a conexão com o tecido conjuntivo que se encontra subjacente, dessa maneira um dos lados está sempre aderido ao tecido conjuntivo, denominado de polo basal e o outro encontra-se livre, polo apical. Dessa forma, o epitélio que reveste os vasos sanguíneos e linfáticos forma o epitélio pavimentoso simples, denominado também de endotélio. O endotélio caracteriza-se por ser avascular e obtêm nutrientes necessários a partir dos vasos sanguíneos presentes na camada de tecido conjuntivo (Junqueira, 2017).

Do ponto de vista fisiológico, o endotélio, exerce controle sobre o tráfego de moléculas pois atua como uma membrana semipermeável na síntese e metabolismo de diversas substâncias, tendo como mais importante o papel na regulação do fluxo sanguíneo, resistência vascular e na modulação de respostas imunológicas e inflamatórias (Carvalho Mhc, 2001; Junqueira, 2017).

As células epiteliais e endoteliais estão organizadas em camadas e aderidas umas às outras, formando folhas polarizadas ou camadas de células que são conectadas por meio de junções comunicantes (junções gap), junções intercalares, junções de aderência, junções de oclusão, os desmossomos e hemidesmossomos se conectam ainda mais com os filamentos intermediários da citoqueratina, específicos para o epitélio. Essas junções estabelecem comunicações extracelulares entre células adjacentes e os diferentes elementos do citoesqueleto, de forma a manter a homeostase regulando assim a integridade estrutural dos tecidos, difusão de íons, solutos, proliferação celular e migração (Medici e Kalluri, 2012; Garcia *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2019).

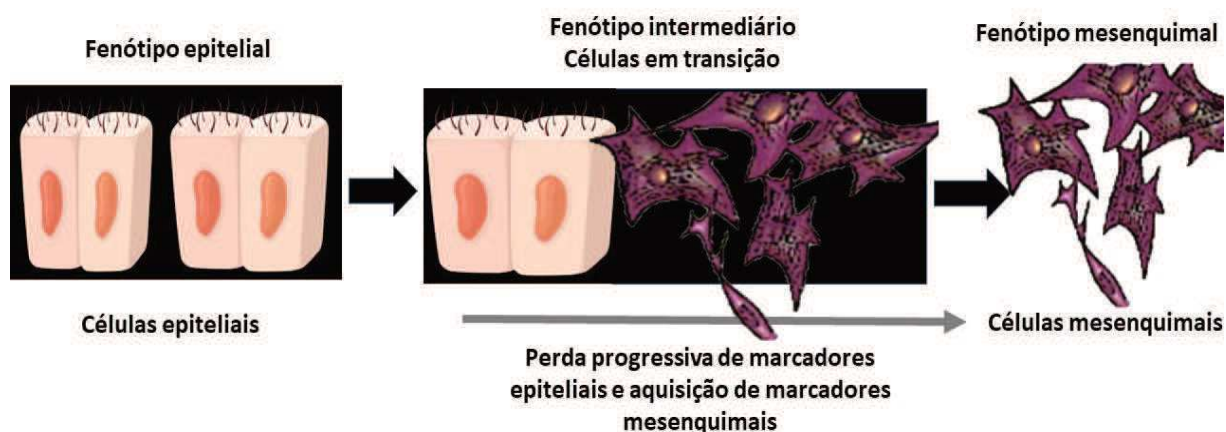
As células epiteliais são conhecidas por expressarem marcadores específicos como E-caderina, ocludinas, claudinas e citoqueratinas. Enquanto que as endoteliais expressam receptor do fator de crescimento endotelial vascular (*VEGFR*), VE-caderina (*CD144*), molécula de adesão celular endotelial plaquetária (*PECAM/CD31*), ambos apresentam morfologia poliédrica (Kalluri e Zeisberg, 2006; Medici e Kalluri, 2012).

Diferente das células epiteliais e endoteliais as células mesenquimais apresentam morfologia fibroblastóide com forma alongada, incorporam-se dentro da matriz extracelular (ECM) e raramente estabelecem contato estreito com as células vizinhas, o que contribui com sua capacidade migratória. Sua identificação é baseada na expressão de um conjunto de marcadores como Vimentina, colágeno tipo 1, N-caderina, Fibronectina, FPS-1 (*fibroblast specific protein 1 ou S100A4*) (Saito *et al.*, 2013; Tsai e Yang, 2013).

### **1.1.2. Transição epitélio-mesenquimal (EMT) no Câncer**

Em 1982 foi demonstrado pela primeira vez por Elizabeth Hay o termo transição epitélio-mesenquimal do inglês (*Epithelial-mesenchymal transition*), o qual refere-se a capacidade das células epiteliais adquirirem características mesenquimais (Greenburg e Hay, 1982). Durante esse processo, as células epiteliais perdem a polaridade celular, regulam negativamente as citoqueratinas e moléculas de adesão como E-caderina e integrinas epiteliais, passam a adquirir fenótipo mesenquimal, com formação remodelada do citoesqueleto de actina, através das fibras de *stress* e protrusões contráteis, enfatizado pelo aumento da capacidade migratória e invasiva, demonstrando assim, resistência a apoptose e aumento na produção de componentes da matriz extracelular como metaloproteases de matriz (MMPs) que degradam a membrana basal permitindo a invasão

do estroma adjacente como representado pela figura 3 (Hay, 1995; 2005; Kalluri e Weinberg, 2009; Thiery *et al.*, 2009; Lamouille *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2016).



**FIGURA 3: Transição epitélio-mesênquima (EMT) e plasticidade das células epiteliais.**

Durante a (EMT) as células perdem sua polaridade ápico-basal, devido à perda das junções ocludentes permite a mistura das proteínas de membrana, mediadores de e-caderina e integrinas epiteliais em vermelho são perdidas e substituídas por junções mesenquimais como N-caderina.

**FONTE:** adaptado e modificado de Micalizzi, 2010.

Nas últimas décadas, diversos estudos demonstraram fortes evidências no programa de desenvolvimento da EMT durante progressão, invasão e metástase do câncer sendo também chamado de EMT tipo 3 (EMT 3), para diferencia-lo do tipo 1 que ocorre durante a embriogênese (EMT1) e regeneração tecidual tipo 2 (EMT2), eles possuem características semelhantes entre si, além de conferir características de células-tronco, contribuir para quimiorresistência e mau prognóstico (Mani *et al.*, 2008; Felipe Lima *et al.*, 2016). Portanto acredita-se que a EMT seja crítica para a embriogênese, para o desenvolvimento de órgãos, além de estar relacionada a diversos processos patológicos, incluindo fibrose e progressão do câncer (Kalluri e Weinberg, 2009; Thiery *et al.*, 2009).

Diversos estudos têm demonstrado que os fatores de transcrição como *SNAIL*, *SLUNG*, *TWIST*, *FOXC2*, *KLF8*, *TCF3* apresentam papel crítico durante a EMT. A ativação desses fatores leva a inibição do gene da E-caderina resultando em perda das junções célula-célula, além do aumento da capacidade migratória e consequentemente invasiva do tumor (Yang *et al.*, 2004; Nieto, 2011; Wendt *et al.*, 2011) (Figura 3).

A expressão elevada do *TWIST* no carcinoma lobular invasivo diminuiu os níveis de E-caderina induzindo a perda de adesão célula-célula, além de ativar marcadores mesenquimais e induzir motilidade celular. Em adição, a expressão elevada de *ZEB1*, *ZEB2* e *SNAIL*, produz o fenótipo mesenquimal nas células cancerígenas, o qual está associado ao aumento da expressão de marcadores mesenquimais como vimentina e integrinas específicas, bem como a aquisição de uma morfologia fibroblastóide com ganho de propriedades invasivas e migratórias (Karreth, 2004; Yang *et al.*, 2004; Wendt *et al.*, 2011). Esses mesmos marcadores também possuem participação na EndMT (Medici e Kalluri, 2012).

O *TGF- $\beta$*  desempenha um papel de extrema importância no processo de EMT no câncer e embriogênese. A sinalização via *TGF- $\beta$*  pode alterar a formação de junções estreitas no epitélio mamário e induzir a sinalização em várias vias de sinalização embrionárias, incluindo as vias *Wnt*, *Notch* e *Hh*. Durante a EMT, a ativação de *SNAIL* e *SNAI2* / *SLUNG* esta associada à via de sinalização do *TGF- $\beta$*  com objetivo de iniciar o crescimento tumoral e metástase de forma a inibir ou suprimir a transcrição de E-caderina, ocludina e claudina (Quadro 1) (Kelleher *et al.*, 2006; Takebe *et al.*, 2011).

Células epiteliais		Células mesenquimais	
Marcadores moleculares	Características celulares	Marcadores moleculares	Características celulares
E-caderina	Adesão intercelular	N-caderina	Alta mobilidade
Citoqueratinas	Imobilidade	Vimentina	Invasivas
ZO-1	Não-invasivas	NCAM	Vivem sem adesão
Ocludina	Anoikis	Snail	Resistência ao fenômeno anoikis
Desmoplaquina	Polarizadas	Twist	Não polarizadas

**QUADRO 1:** Diferenças moleculares e celulares entre células epiteliais e mesenquimais. *SNAIL*, *TWIST*, *VIMENTINA*, dirigem células epiteliais não móveis para adquirir fenótipos mais invasivos, e as células cancerígenas podem se translocar para novos locais e com certas características que permitam o início do crescimento metastático.

**FONTE:** (modificado TAKEBE E WARREN 2011).

A EMT possui outra forma extremamente importante e especializada que está intimamente relacionada aos processos fisiológicos e patológicos no câncer, denominada transição endotélio-mesenquimal (EndMT). A EndMT é caracterizada pela presença de células endoteliais (CE's) que se originam do mesoderma esplânico do embrião e posteriormente se diferenciam em estruturas vasculares nos diferentes órgãos e tecidos. Os vasos formados podem especializar-se em veias, artérias e capilares apresentando estrutura e funções diferentes, sendo a principal delas a função de revestimento da parede dos vasos (Fidler e Ellis, 2004). Além da função de revestimento, as células endoteliais exibem a capacidade e plasticidade de transitar para o fenótipo mesenquimal, nesse mecanismo as CE's perdem as junções célula-célula alterando a organização e composição do citoesqueleto, alterando a morfologia celular para o formato fusiforme. Durante a transição, as CE's perdem a expressão dos marcadores endoteliais específicos VE-caderina e CD31 e passam a expressar marcadores mesenquimais, vimentina, fibronectina, colágenoI, N-caderina, com propriedades invasivas e migratórias

possibilitando que tecidos circundantes sejam acometidos. A EndMT é um importante processo de migração do endotélio e formação de novos vasos no câncer (Inagaki *et al.*, 2008; Medici e Kalluri, 2012).

#### **1.4. Angiogênese e Metástase tumoral**

A angiogênese e vasculogênese são definidos como um processo de formação de novas estruturas vasculares de vasos sanguíneos já existentes e que estão envolvidos durante o desenvolvimento, formação de órgãos, regeneração tecidual, processos de reparo como a cicatrização de feridas. Esse processo também está interligado com as alterações patológicas, incluindo crescimento tumoral e metástase, que estão envolvidas diversas etapas como a ativação endotelial, ruptura da membrana basal, invasão da matriz extracelular por brotamentos endoteliais para que se desenvolvam a partir dos vasos pré-existentes e por fim o remodelamento completo do novo vaso (Folkman, 1995; Risau, 1997; Pepper *et al.*, 1998; Fidler e Ellis, 2004).

A propagação do câncer depende de múltiplas interações ("crosstalk") entre as células tumorais com os mecanismos homeostáticos. Além disso, as células tumorais podem usurpar os mecanismos de indução e manutenção da vasculatura e produzirem e excretarem fatores pró-angiogênicos como VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular), bFGF (Fator de Crescimento de Fibroblasto Básico) e angiopietinas que atuam na indução da proliferação, migração e diferenciação dos novos capilares (neoangiogênese). A vascularização do tumor que permite a continuidade de suprimento de oxigênio e nutrientes às células cancerosas, bem como cria uma via de escape para formarem metástase (Papetti e Herman, 2002; Fidler e Ellis, 2004; Weis e Cheresh, 2011).

A angiogênese tumoral forma vasos heterogêneos em diâmetro e frágeis; além de ramificações com extremidades que estão mortas. Essas anormalidades resultam em um



balanço anormal de moléculas sinalizadoras, suprimento inadequado de sangue para o tumor, levando a hipóxia nas regiões afetadas. As células não podem sobreviver se não tiverem suprimentos adequados de oxigênio e nutrientes ou se forem incapazes de eliminar moléculas tóxicas. A hipóxia por sua vez, seleciona células cancerosas mutantes, que se adaptaram melhor ao ambiente inóspito a que foi submetido resultando em células metastáticas com maior poder de malignidade. Por esta razão, existe correlação entre angiogênese e malignidade. Quanto maior a angiogênese, maior é a capacidade metastática tumoral e com maior velocidade a progressão do câncer (Fidler e Ellis, 2004; Filho, 2006; Alberts, 2010; Weis e Cheresh, 2011).

O termo "metástase" foi criado em 1829 por Jean Claude Recamier ao caracterizar e descrever um tumor maligno que tempos depois fora encontrado em outro lugar (Anthelme, 1829). Após mais de 100 anos de estudo sobre a metástase só recentemente foi descoberto os mecanismos pelos quais os tumores primários se tornam metastáticos e as razões sobre a predileção dos mesmos para órgãos específicos, sendo então definidos como o passo de maior impacto na progressão do câncer.

As células não malignas não são capazes de entrar em processo metastático, já que em condições de estado estacionário, elas somente proliferam conforme a necessidade de substituição à medida que envelhecem ou se lesionam. No entanto, isso pode ser alterado e resultar em proliferação descontrolada e na formação de um tumor, que a princípio pode ser caracterizado como benigno ou maligno. Os tumores benignos são geralmente de crescimento lento, encapsulados em uma cápsula fibrosa, não invasivos e são morfológicamente parecidos com seu precursor celular. Se um tumor benigno não estiver próximo de um tecido vascular ou neural, o diagnóstico e o tratamento imediatos resultam em cura. Em contrapartida, os tumores malignos raramente encapsulam, crescem em uma velocidade excepcional, além de invadir tecidos regionais e com anormalidades

morfológicas, de tal forma que seu tecido de origem pode ser irreconhecível (Chambers *et al.*, 2002; Weigelt *et al.*, 2003; Talmadge e Fidler, 2010).

Do ponto de vista molecular sabe-se que cada célula possui uma série de genes (unidade biológica da hereditariedade, que se auto-reproduz e é transmitida para outras gerações) que controlam as funções de crescimento e divisão celular. Os genes cujas alterações produzem ou contribuem para o aparecimento do câncer são denominados oncogenes (do grego *onkos*= tumor), e o homólogo celular normal constitui o proto-oncogene. Embora, a base genética da tumorigênese possa variar segundo os diferentes tipos de câncer, os passos celulares e moleculares requeridos para a metástase são geralmente similares para todas as células tumorais (Strancar *et al.*, 2010).

A capacidade metastática é adquirida tardiamente na tumorigênese sendo considerado um processo não aleatório e altamente seletivo, além de ser responsável por aumentar a malignidade do tumor, e conseqüentemente ser responsável pelos altos índices de mortalidade. Para que a metástase se desenvolva são necessários múltiplos processos celulares que se tornam essenciais para seu desenvolvimento, dentre eles: a degradação da matriz extracelular (ECM), a transição epitelial-mesenquimal (EMT), a angiogênese tumoral, o desenvolvimento de um microambiente tumoral inflamatório e a disfunção da maquinaria programada de morte celular. É importante citar que a disseminação do tumor para órgãos distantes é geralmente considerado letal (Chambers *et al.*, 2002; Fidler, 2003; Gupta *et al.*, 2004; Talmadge e Fidler, 2010; Su *et al.*, 2015).

A plasticidade das células tumorais é demonstrada pela capacidade que possuem em adotar uma variedade de fenótipos, incluindo o fenótipo endotelial (Strancar *et al.*, 2010). Visto isso, as células tumorais precisam de algumas mudanças genéticas e fenotípicas para adquirirem essa capacidade metastática. Primeiramente, durante a invasão celular as células precisam ultrapassar o epitélio normal, considerado uma

barreira intrínseca para a invasão, durante esse processo, ocorrem mudanças na preferência adesiva das células, ou seja, das células epiteliais para os fibroblastos e células endoteliais que determinam suas interações recíprocas com a MEC e as células estromais vizinhas. A maioria das moléculas de adesão celular (CAMs) pertencem as famílias das integrinas, a superfamília de imunoglobulinas e as caderinas (Cavallaro e Christofori, 2004; Gupta e Massague, 2006; Hanahan e Weinberg, 2011).

Em seguida, o Mecanismo de Transição Epitélio Mesenquimal (EMT), é ativado, e as modificações estão agrupadas sobre o termo EMT, permitindo que as células migrem localmente e degradem a lâmina basal e o estroma peritumoral. As células expressam alterações na morfologia com características fibroblásticas e expressam alterações fenotípicas associada a uma diminuição da expressão da E-caderina, permitindo que as células individualizem e aumentem a expressão da fibronectina, vimentina ou N-caderina, além da sua invasividade (Strancar *et al.*, 2010; Coussy *et al.*, 2019). Ultimamente tem se mostrado importante alvo para estudos terapêuticos, sendo controlado por fatores de transcrição que respondem aos estímulos como do TGF $\beta$  (Fator de Transformação do Crescimento beta) EGF (Fator de crescimento epidermal), FGF (Fator de crescimento fibroblastóide) e PDGF (Fator de crescimento derivado de plaquetas humanas), libertado mais frequentemente pelas células estromais. Sendo importante salientar que a maioria dos canais de sinalização ativados convergem para a indução de repressores transcricionais da E-caderina como os repressores *Snail*, *Slug*, *Zeb1*, *Zeb2* e *Twist* (Yang *et al.*, 2004; Klaus e Birchmeier, 2008; De Cock *et al.*, 2016; Coussy *et al.*, 2019).

As células alcançam o sistema sanguíneo, escapam da vigilância imune; e podem se alojar em um novo órgão. Com isso, as células adquirem novas propriedades adesivas na matriz extracelular, pela expressão de um novo diretório de integrinas. A invasão é então facilitada pelo sistema proteolítico das células EMT, em particular pelas

metaloproteases da matriz (MMP1 e MMP9, Metaloproteinases de matriz 1 e 9) que ao degradar as proteínas da membrana basal e da matriz extracelular auxiliam no processo de invasão (Rolli *et al.*, 2003; Guo e Giancotti, 2004; Seguin *et al.*, 2015; Coussy *et al.*, 2019)

## **1.5. Resistência aos principais processos de morte celular pelas células tumorais**

### **1.1.3. Apoptose e Necrose**

O equilíbrio natural da homeostase tecidual é dependente de diferentes fatores que atuam na regulação da proliferação, na diferenciação celular, indução da morte celular programada e através da capacidade de sobrevivência. O processo de morte celular programada, ou apoptose, é geralmente caracterizado pelas características morfológicas distintas e pelos mecanismos bioquímicos dependentes de energia. Sendo assim, a apoptose é considerada um componente vital de vários processos, dentre eles pode-se considerar a apoptose, necrose e senescência celular, salientando que, qualquer mutação que ocorra neste processo pode acarretar na formação do tumor (Kerr *et al.*, 1972)

A apoptose desde 1972 tem sido descrita e considerada como uma morte celular pré-programada geneticamente. Ela demanda um gasto energético para sua execução, sendo que pode ser desencadeada por fatores, como o estresse oxidativo, lesões no DNA, citotoxicidade, dentre outros (Frame *et al.*, 2016). No entanto, é importante notar que outras formas de morte celular programada são descritas e que ao final do processo de apoptose os restos celulares são fagocitados por macrófagos, e neste caso não há extravasamento celular, logo o dano tecidual não ocorre (Formigli *et al.*, 2000; Elmore, 2007).

O processo apoptótico celular pode ocorrer por duas vias, via extrínseca e via intrínseca. Esse processo é desencadeado por receptores transmembranares como o

*TNFR-1* ou *Fas* que possuem um domínio denominado, Domínio de morte, ou DD (*Death domain*) o qual difunde o sinal pró-apoptótico através da ativação pela via das caspases. A ativação da *Caspase-8* dá origem a um complexo de sinalização conhecido como Complexo de Sinalização para a Indução de Morte (*DISC - Death-inducing signalling complex*) (Elmore, 2007; Ouyang *et al.*, 2012).

A via *Fas*, desempenha um papel importante no sistema imunológico, contribuindo para a citotoxicidade mediada por linfócitos T citotóxicos e regulação negativa das respostas imunes. A ativação da via *Fas* pelo seu ligante ou anticorpos agonistas induzem o receptor *Fas* a expor seu domínio de interação proteína-proteína intracelular, também conhecido como o domínio da morte (DISC), que transduz o sinal de morte *Fas /APO-1*. O complexo DISC desencadeia a ativação de caspases efetoras (*Caspase-3, 6 e 7*), finalizando assim a ativação da apoptose celular (Chinnaiyan *et al.*, 1997; Sánchez *et al.*, 1999; Nunes *et al.*, 2014).

A via intrínseca ou via mitocondrial é ativada por uma gama de estímulos exógenos e endógenos. Nela estão inclusos danos no DNA, isquemia, estresse oxidativo, radiação, ativação de oncogenes, hipóxia, dentre outros. Essas alterações têm propriedade de modificar a permeabilidade da membrana mitocondrial externa, acarretando na perda do potencial de membrana e com isso na interrupção da síntese de ATP. Há também liberação de proteínas pró-apoptóticas e elevada produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)(Oda *et al.*, 2000; Oren, 2003; Loreto *et al.*, 2014).

A via intrínseca, desempenha uma importante função no desenvolvimento e na eliminação de células danificadas já que é influenciada por membros da família *bcl* ligados à membrana mitocondrial, incluindo *Bax* e *BCL-2*, que atuam como proteínas reguladoras pró ou antiapoptóticas, respectivamente. Na via intrínseca, a consequência funcional da sinalização pro-apoptótica é a perturbação da membrana mitocondrial e

liberação do citocromo C no citoplasma, onde forma um complexo com o fator ativador da protease apoptótica 1 (*APAF1*) e a forma inativa da caspase 9. Este complexo hidrolisa adenosina trifosfato para clivar e ativar a caspase 9 que inicia e ativa as caspases executoras 3, 6 e 7, resultando em apoptose celular. As proteínas antiapoptóticas *BCL-2* e *BCL-XL* inibem a liberação de citocromo C (Kuwana *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Galluzzi *et al.*, 2012)

Uma alternativa à morte celular por apoptose é a necrose, considerada um processo tóxico em que a célula se torna vítima passiva e segue para uma morte independente de energia. Por isso, para iniciar o processo de necrose, o estoque de ATP é exaurido pela PARP (enzima que participa do reparo do DNA), que determina a mudança de apoptose para necrose. Nesse processo morfológico, as células e organelas incham, ocorre disfunção mitocondrial, permeabilização da membrana e liberação de conteúdo citoplasmático para o microambiente, causando uma resposta inflamatória sem envolver fragmentação do DNA (Sánchez *et al.*, 1999; Elmore, 2007; Nunes *et al.*, 2014).

#### **1.1.4. Autofagia**

A autofagia é uma palavra de origem grega cujo significado é (*auto* = eu e *fagia* = comer) "auto-alimentação", esse termo foi utilizado pela primeira vez por Christian de Duve em 1963 (Klionsky, 2008). Processo conhecido como mecanismo celular para reciclar suas próprias organelas que não são mais essenciais e que podem ser ativadas pela falta de nutrientes e fatores de crescimento no microambiente extracelular (Kroemer e Jaattela, 2005).

A autofagia é uma das principais respostas das células aos estímulos externos ou internos, especificamente macro-autofagia considerado um processo catabólico, evolutivamente conservado, no qual os conteúdos citoplasmáticos de uma célula são

sequestrados dos vacúolos internos de membrana dupla, chamados de autofagossomos, e posteriormente liberados no lisossomo para degradação. Esse processo também pode funcionar como um mecanismo de sobrevivência das células, sendo que ao mesmo tempo, é um processo comum observado em células que já estão mortas, levando à sua classificação como uma forma alternativa de morte celular programada. A contribuição funcional da autofagia para a morte celular tem sido objeto de grande controvérsia. No entanto, vários estudos têm demonstrado o papel da autofagia tanto na morte celular quanto na sobrevivência (Debnath *et al.*, 2005; Kroemer e Jaattela, 2005; Nunes *et al.*, 2014).

A maquinaria intracelular da autofagia é composta por um complexo de proteínas formado pela fosfatidilinositol-3-quinase de classe III (*PI3K*), também conhecida como Vps34, e a proteína do domínio BH3 que interage com *BCL-2*, Beclin-1 (*BECN1*). Ambas as proteínas são necessárias para a formação do autofagossomo. Sendo que o autofagossomo é composto por uma vesícula derivada do lisossomo de membrana dupla que cataboliza as partículas e organelas não essenciais ou danificadas. No contexto do câncer, a autofagia tem sido descrita por ter um papel ambíguo, pois em associação com a apoptose, ela é capaz de atuar como um supressor tumoral. Por outro lado, defeitos no processo autofágico, em conjunto com apoptose anormal, podem desencadear tumorigênese e resistência terapêutica (Goldsmith *et al.*, 2014; Kenific *et al.*, 2016).

## **2. Câncer de Mama**

O Câncer de mama é a neoplasia mais frequente entre as mulheres desde o ano de 2012, e o impacto dessa doença chega a atingir 2,1 milhões de mulheres a cada ano, sendo considerada a principal causa de óbito por câncer entre elas em todo o mundo. Em 2018,

estimou-se que 627.000 mulheres morreram de câncer de mama, representando cerca de 15% de todas as mortes por câncer entre as mulheres no mundo (Ferlay *et al.*, 2015; Who, 2015; 2018).

O câncer de mama é considerado uma doença heterogênea segundo suas características patológicas. Seu acompanhamento é complexo devido à existência de diversos grupos e subgrupos devido aos perfis de expressão, resposta terapêutica e comportamentos clínicos diferentes entre eles. Em contrapartida, o câncer de mama só pode ser classificado como hereditário quando é caracterizado por mutações parentais herdadas, e que estejam envolvidos oncogenes que atuam de forma direta ou indireta no reparo do DNA como, por exemplo, os genes *BCRA1*, *BCRA2*, *TP53*, *ATM* e *CHEK2* (Weigelt *et al.*, 2005; Cheang *et al.*, 2008; Cheang *et al.*, 2009; Kennecke *et al.*, 2010; Bogdanova *et al.*, 2013; Boyd, 2014; Kalia, 2015).

Nos últimos 30 anos, a revolução do oncogene estimulou a pesquisa, revelando que existem fenótipos cruciais, característicos das células tumorais e que resultaram em uma série de mutações na qual se combinaram com objetivo de alterar as múltiplas vias de sinalização. Além disso, dados de sequenciamento de alto rendimento sugerem que as mutações que levam à tumorigênese são ainda mais numerosas e heterogêneas do que se pensava. Desvendando, existem milhares de mutações pontuais, translocações, ampliações e deleções que podem contribuir para o desenvolvimento do câncer, essas descobertas permitiram estratificar o câncer de mama em três principais grupos, baseados nos marcadores celulares e com reflexo direto na terapia (Perou, C. M. *et al.*, 2000; Boyd, 2014; Khaled e Bidet, 2019).

- a) Receptores de estrogênio (RE) positivo ou Receptor de Progesterona (RP) positivos;



- b) HER2 total positivo, com ou sem positividade para um dos receptores, sendo estrógeno (RE) ou progesterona (RP);
- c) Câncer de mama Triplo negativo (TNBC) que são caracterizados pela ausência de positividade nos receptores de estrógeno, progesterona e amplificação do gene HER2; (Perou, C. M. *et al.*, 2000; Colditz *et al.*, 2006; Sorlie *et al.*, 2006; Engebraaten *et al.*, 2013).

Diante dessa difícil descoberta, em meados de 2001, foi adotada pela comunidade médica-científica uma nova classificação, para o carcinoma mamário, e o mesmo foi distribuído entre 5 principais e mais explorados subgrupos moleculares hoje conhecidos (Perou, C. M. *et al.*, 2000; Sotiriou *et al.*, 2003).

- **Luminal A:** (fenótipos RE e/ou RP positivo e HER2 negativo), são caracterizados pela alta expressão do receptor de estrogênio (*ESR1*) e de genes de células epiteliais luminais, como as citoqueratinas luminais (CK 8 e 18). Estudos recentes demonstram que esse subtipo, pode apresentar índice de KI-67 (proliferação), em torno de 14% das células neoplásicas com imunomarcagem para anticorpos específicos, baixa taxa de mutação além de serem frequentemente diploides de baixo grau. Este fenótipo está associado a um melhor prognóstico, por não apresentar expressão aumentada de HER2 (Perou, C. M. *et al.*, 2000; Sotiriou *et al.*, 2003; Sorlie *et al.*, 2006).
- **Luminal B:** Exibem em sua maioria fenótipos RE e/ou RP positivos, e também expressam em conjunto o gene *HER2*. Este subgrupo foi caracterizado por baixa ou moderada expressão de citoqueratinas (CK) 7, 8, 18 e 19 pelas células epiteliais luminais. Este fenótipo possui pior prognóstico em relação ao A, e apresenta um maior número do índice de proliferação dos genes *MKI67*, (Ki-67) e *CCNB1* sendo particularmente relacionado à recidiva tumoral e por apresentar possíveis

similaridades com os tumores RE negativos (subtipo Superexpressão do *HER2* e Basal). Provavelmente, este perfil esteja ligado a mutações genéticas (Sorlie *et al.*, 2006; Cheang *et al.*, 2009; Voduc *et al.*, 2010).

- **Superexpressão de *HER2*:** Os tumores que apresentam essa denominação, possui elevada expressão da oncoproteína *HER2*, porém apresenta negatividade para receptores hormonais. Esse subgrupo pela alta expressão dos genes *ERBB2*, *GRB7*, *MED24* e *MED1* (Perou, Charles M. *et al.*, 2000) e possui o segundo pior prognóstico (alta agressividade) em relação aos demais, entretanto, a utilização de terapia alvo-específica (trastuzumabe, pertuzumabe, lapatinibe), tem demonstrado ser extremamente eficaz, tanto na forma adjuvante, quanto no contexto metastático. O Trastuzumabe é um anticorpo monoclonal humanizado que existe há mais de 10 anos, cujo efeito está na melhora das taxas de resposta, reduz a progressão da doença e melhora a sobrevida quando utilizado isoladamente ou adicionado à quimioterapia em câncer de mama metastático. O lapatinibe, inibidor da tirosina quinase, atua inibindo não só o receptor do fator epidérmico *HER2* como também o *HER1*, sendo utilizado em pacientes que não apresentaram eficácia com o trastuzumabe (Geyer *et al.*, 2006; Rakha *et al.*, 2010; Wolff *et al.*, 2013).
- **Subtipo Basal:** Exibem (fenótipos RE e RP negativo/*HER2* negativo), caracterizado pela expressão de vários genes expressos nas células progenitoras ou células basais/mioepiteliais. Segundo vários autores, este fenótipo mostra positividade para *CK5/6*, receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*), Anexina A8 (*ANXA8*), Caderina3 do tipo I (*CDH3*), p63 e *CK17* que são proteínas expressas nas células basais/mioepiteliais. O perfil está ligado a mutações genéticas sendo um dos mais intrigantes subtipos tumorais, pois demonstra padrão

prognóstico mais reservado, associado a menor sobrevida livre da doença e a menor sobrevida global (Perou, Charles M. *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2001; Sorlie *et al.*, 2003; Sorlie *et al.*, 2006).

- **Triplo Negativos (TN):** Apesar desses tumores serem definidos como um grupo distinto entre os subgrupos do câncer de mama, eles são conhecidos por não apresentarem RE, RP ou outros genes epiteliais ou luminais, negativos para *HER2* e frequentemente superexpressam (*EGFR*) receptor do fator de crescimento epidérmico. Esse subgrupo apresenta com frequência rearranjos cromossômicos complexos e mutação do gene *TP53*, *PIKCA3* com aneuploidia de alto grau (Kwei *et al.*, 2010). Apresentam ainda, baixa expressão de genes envolvidos com junções celulares ocludentes e glicoproteínas de adesão célula-célula, incluindo as claudinas 3, 4 e 7; as ocludinas e E-caderina (Herschkowitz *et al.*, 2007). Apresenta aumento na expressão de marcadores de transição epitélio-mesênquima, de marcadores endoteliais e linfocíticos e de marcadores relacionados às células tronco tumorais, com fenótipo CD44+/CD24- (Sorlie, 2007; Irvin e Carey, 2008; Curtis *et al.*, 2012).

Os tumores basaloide têm baixa expressão do gene *BRCA1*, causada por metilação de seu gene – promotor ou por inativação de transcrição de *BRCA1*, ou por ambos. Devido à ausência de imunomarcção de RE, RP e *HER2*, tumores basaloide são ainda chamados por alguns autores de “tumores triplo-negativos” (TTN), entretanto já é descrito que os tumores basaloide não são considerados triplo negativos completos e podem ser mais bem descritos como “tumores triplo-negativos não basaloide (Perou, Charles M. *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2001; Sorlie *et al.*, 2003; Cheang *et al.*, 2008; Kennecke *et al.*, 2010). Nesse contexto, os tumores do subtipo triplo negativo (TN) representam um desafio para a ciência, pois além de apresentarem mau prognóstico com

recaída metastática agressiva, não apresentam terapia alvo específica (Khaled e Bidet, 2019).

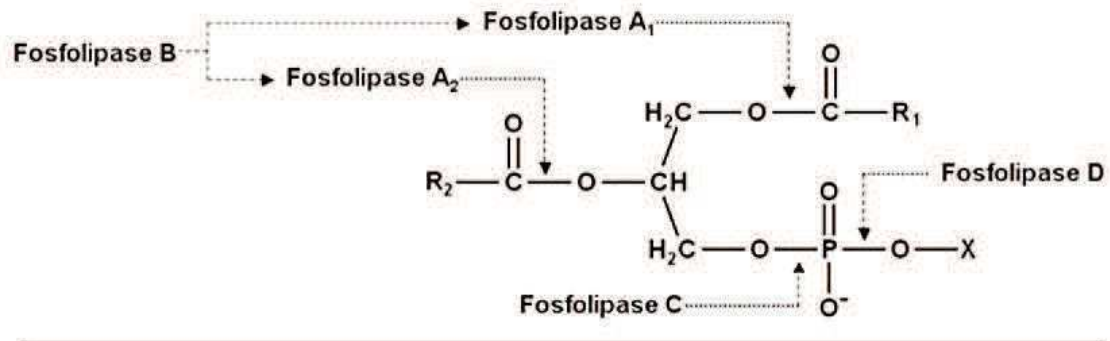
Desde 1970 tem sido descrito métodos que proporcione o crescimento de células especializadas *in vitro*. Atualmente as linhagens celulares tumorais, apesar de representarem células que sobreviveram à seleção *in vitro*, constituem um modelo amplamente utilizado na pesquisa. Em se tratando do câncer de mama ela se tornou uma poderosa ferramenta em substituição há alguns ensaios *in vivo*, principalmente em experimentos toxicológicos, salientando que a cultura de células permite o acompanhamento, desenvolvimento e diferenciação celular para avaliar os principais estudos bioquímicos e de manipulação genética. Além disso, elas demonstram uma grande similaridade molecular e biológica das diversas linhagens celulares com os tumores primários. Atualmente diversas linhagens de câncer de mama representam os diferentes subtipos tumorais descritos (Murray e Stout, 1954; Gerner Re, 1975; Davis, 1994; Ri., 1994).

As células tumorais produzem uma série de peptidases que tem sido associada ao desenvolvimento e invasividade tumoral, já que participam de vários processos pró-tumorigênicos: angiogênese, adesão, proliferação, invasão e metástases, e por meio de extensiva degradação podem modificar e remodelar a matriz extracelular (MEC), além de regularem a biodisponibilidade dessas moléculas. Nos últimos dez anos, pesquisas relacionadas ao câncer de mama têm avançado e demonstrado que os aspectos moleculares estão relacionados principalmente com a perda de inibição do contato celular, a insensibilidade aos sinais de crescimento e principalmente a resistência a autofagia e apoptose (Yang *et al.*, 2011; Williams e Cook, 2015; Zóia Map, 2017; Wang *et al.*, 2019; Zoia *et al.*, 2019).

Nesse contexto, diferentes estudos têm demonstrado o papel das diferentes toxinas de peçonhas de serpentes e como estão sendo investigadas pelo seu papel antitumoral, por seus efeitos citotóxicos além do grande potencial para degradar e destruir células tumorais. Estudos demonstram que as toxinas são capazes de atuar em diferentes vias de morte, através da inibição da adesão, migração, invasão e dano no DNA. Além disso, exercem papel de inibir a EMT e por serem capazes de atuar na sobrevivência e progressão tumoral e por seu papel antiangiogênico. Esses resultados abriram novas perspectivas com objetivo de compreender as atividades associadas as toxinas de serpentes, ou a compreensão dos mecanismos moleculares ou ferramentas que elucidem o desenvolvimento de futuros fármacos para terapia contra o câncer de mama, em especial o subtipo triplo negativo (Son *et al.*, 2007; Bazaá *et al.*, 2009; Azevedo *et al.*, 2016; Tsai *et al.*, 2016a; b; Urra e Araya-Maturana, 2017; Silva, Lopes, Teixeira, Gimenes, Van Petten Vasconcelos Azevedo, *et al.*, 2018).

### **3. Classificação, característica e função das fosfolipases A<sub>2</sub>**

As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub> EC 3.1.1.4) são uma superfamília de enzimas, amplamente distribuída nos organismos vivos, sendo classificada em 15 grupos e diversos subgrupos segundo sua estrutura, massa molecular e função. A ação das PLA<sub>2</sub>s é catalisar a hidrólise de ligações acil-éster na posição *sn*-2 dos fosfolipídeos presentes nas membranas celulares em ácidos graxos livres, ácido araquidônico e lisofosfolipídeos, sendo o produto dessa reação denominado com base nos sítios em que a hidrólise acontece, como representado na Figura 4 (Arni e Ward, 1996; Kini, 2003). (Burke e Dennis, 2009; Huancahuire-Vega *et al.*, 2011; Aloulou *et al.*, 2012).



X: álcool polar como colina, serina, etanolamina, mio-inositol, glicerol e fosfatidilglicerol  
 R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub>: cadeias hidrocarbônicas de ácidos graxos

**FIGURA 4:** Representação esquemática de um fosfolípido. Locais de atuação das diferentes fosfolipases. Adaptado KINI, 1997. (FONTE: OLIVEIRA, 2006).

A reação de hidrólise dos fosfolípidos de membrana é dependente dos íons cálcio, sendo a unidade catalítica formada pelos aminoácidos His 48, Asp 49 e uma molécula de água. Os produtos gerados pela catálise destas enzimas são ácidos graxos poli-insaturados como: Ácido araquidônico (AA), precursor de eicosanoides e segundos mensageiros de processos fisiológicos e patológicos e o Ácido oléico (AO), reserva energética (Scott *et al.*, 1990; Dennis, 1994; Yu *et al.*, 1998; Gijon e Leslie, 1999). E os lisofosfolípidos liberados, em contrapartida, estão envolvidos na sinalização celular e remodelamento dos fosfolípidos, com contribuição importante nos processos biológicos. Em adição, sabe-se que a atividade catalítica das fosfolipases produz lisofosfolípidos, precursor do fator ativador de plaquetas (PAF), caracterizado como importante mediador inflamatório na agregação plaquetária (Quinn *et al.*, 1988; Valentin e Lambeau, 2000; Kudo e Murakami, 2002).

As PLA<sub>2</sub>s estão distribuídas em 6 categorias principais e distribuídas em 16 grupos, seguindo os critérios de localização celular, sequência de aminoácidos, massa

molecular, pontes dissulfeto intramoleculares e a dependência do cálcio para o processo de catálise (TABELA 1) (Dennis *et al.*, 2011). A superfamília de PLA<sub>2</sub> incluem: PLA<sub>2</sub> secretadas (sPLA<sub>2</sub>), PLA<sub>2</sub> citosólicas (cPLA<sub>2</sub>), PLA<sub>2</sub> independentes de Ca<sup>2+</sup> (iPLA<sub>2</sub>), PAF acetilhidrolases (PAFAH), PLA<sub>2</sub>s lisossomais e a PLA<sub>2</sub>s específica do tecido adiposo (AdPLA). Cada uma dessas superfamílias tem sido implicada em diversos tipos de metabolismo lipídico e progressão da doença. Isso tem gerado grande interesse indústria farmacêutica e de biotecnologia na busca do conhecimento para cada um desses tipos (Dennis, 1994; Six e Dennis, 2000; Schaloske e Dennis, 2006).

**TABELA 1: Superfamília de PLA<sub>2</sub>**

Adaptada de DENNIS *et al.*, 2011

<b>Tipo</b>	<b>Grupo</b>	<b>Massa Molecular (kDa)</b>	<b>Resíduos catalíticos</b>
<b>sPLA<sub>2</sub></b>	<b>GI</b>	<b>13-15</b>	<b>His/Asp</b>
	<b>GII</b>	<b>13-17</b>	
	<b>GIII</b>	<b>15-18</b>	
	<b>GV</b>	<b>14</b>	
	<b>GIX</b>	<b>14</b>	
	<b>GX</b>	<b>14</b>	
	<b>GXI</b>	<b>12-13</b>	
	<b>GXII</b>	<b>19</b>	
	<b>GXIII</b>	<b>&lt;10</b>	
	<b>GXIV</b>	<b>13-19</b>	
<b>cPLA<sub>2</sub></b>	<b>GIV</b>	<b>60-114</b>	<b>Ser/Asp</b>
<b>iPLA<sub>2</sub></b>	<b>GVI</b>	<b>84-90</b>	<b>Ser/Asp</b>
<b>PAF-AH</b>	<b>GVII</b>	<b>40-45</b>	<b>Ser/His/Asp</b>
	<b>GVIII</b>	<b>26-40</b>	
<b>LPLA<sub>2</sub></b>	<b>GXVI</b>	<b>45</b>	<b>Ser/His/Asp</b>
<b>AdPLA</b>	<b>GXVI</b>	<b>18</b>	<b>His/Cys</b>

As PLA<sub>2</sub> secretadas estão classificadas nos grupos I, II, III, V, IX a XIV e subdivididas nos diversos subgrupos: GIA, GIB, GIIA, GIIB, GIIC, GIID, GIIE, GIIF, GIII, GV, GIX, GX, GXIA, GXIB, GXII, GXIII e GXIV. Elas representam o grupo mais diversificado e o mais bem descrito até o momento. Estas enzimas possuem baixa massa molecular (12 a 19KDa), contem de 5 a 7 pontes dissulfeto, o sítio catalítico possui resíduos de Histidina na posição 48 (considerado o sítio catalítico), e são dependentes do cálcio para atividade catalítica (Scott *et al.*, 1990; Dennis, 1994; Six e Dennis, 2000; Burke e Dennis, 2009).

As sPLA<sub>2s</sub> (grupo GI) são encontradas nas serpentes da família *Elapidae* e *Hidrophidae* e também no suco pancreático dos mamíferos. No grupo GII, estão presentes as PLA<sub>2s</sub> de peçonhas das serpentes *Viperidae*, *Crotalidae* e também na peçonha da serpente Gaboon (GIIB), no testículo de camundongos (GIIC), no baço e no pâncreas de camundongos e humanos (GIID), no útero, cérebro e coração de humanos e camundongos (GIIE) (Six e Dennis, 2000).

No grupo III encontram-se as peçonhas de abelhas e venenos de lagartos, o grupo V contém as sPLA<sub>2</sub> expressas em tecidos como coração e pulmão, em resposta aos estímulos inflamatórios, segregados por macrófagos. O grupo IX isolado do veneno de conus (caracol marinho), a conodipina M. O grupo X, é encontrado no timo, baço, em leucócitos e células alveolares humanas. Os grupos XI e XII foram isoladas em plantas e em células T-helper respectivamente. e por fim, os grupos XIII e XIV são encontradas em Vírus (*Parvovirus*) e em alguns fungos simbiotes (Scott *et al.*, 1990; Balsinde *et al.*, 2002; Murakami e Kudo, 2002; Brown *et al.*, 2003; Chakraborti, 2003; Magro *et al.*, 2003; Schaloske e Dennis, 2006).



#### 4. Fosfolipases A<sub>2</sub> de peçonha de serpentes (svPLA<sub>2</sub>)

As PLA<sub>2</sub>s encontradas nas peçonhas de serpentes das famílias Elapidae e Viperidae pertencem aos grupos IA e IIA, respectivamente. As PLA<sub>2</sub>s do grupo IIA são caracterizadas por uma baixa massa molecular (13-15 kDa), contém uma histidina no sítio catalítico, Ca<sup>2+</sup> ligado ao sítio ativo, bem como seis ligações dissulfeto altamente conservadas com uma ou duas ligações dissulfeto que são variáveis (Scott *et al.*, 1990; Kudo e Murakami, 2002; Murakami e Kudo, 2002).

As PLA<sub>2</sub>s dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* são subdivididas em duas classes principais: 1) cataliticamente ativas: PLA<sub>2</sub>s que possuem um sítio de ligação ao cálcio coordenado pelo grupo carboxílico do resíduo Asp-49, em conjunto com os grupos carbonílicos dos resíduos Tyr-28, Gly-30 e Gly-32 e a presença de duas moléculas de água estruturalmente conservadas, formam a esfera de coordenação para ligação do Ca<sup>2+</sup>; 2) cataliticamente inativas: substituição do resíduo Asp-49 (cadeia lateral negativa) por Lys-49 (cadeia lateral positivo) a fim de alterar significativamente o sítio de ligação de Ca<sup>2+</sup> nas PLA<sub>2</sub> e impedir sua ligação, resultando na baixa ou inexistente atividade catalítica (Soares *et al.*, 2000; Burke e Dennis, 2009; Dos Santos *et al.*, 2011).

Segundo estudos estruturais e funcionais do transcriptoma da glândula venenífera de *bothrops jararacussu*, as PLA<sub>2</sub>s representam a classe de proteínas com maior abundância, resultando em 57,9% da peçonha da serpente, seguido com 25,9% pelas metaloproteases. Dentre a classe de fosfolipases, para a espécie de *B. jararacussu*, 83,2% representam as PLA<sub>2</sub> básicas (Lys) e 0,7% representam as PLA<sub>2</sub>s ácidas (Asp), estas se subdividem em 0,1% em Asp49-PLA<sub>2</sub>(B) e 0,6% em Asp49-PLA<sub>2</sub>(A) (Kashima *et al.*, 2004).

A BthTX-II, é uma importante fosfolipase A<sub>2</sub> Asp49 isolada a partir da peçonha de *Bothrops jararacussu* por Homsí-Brandeburgo (1988). Esta proteína apresenta 120

resíduos de aminoácidos, contendo uma metionina e 14 meias cistinas, massa molecular de 13.976 Da e ponto isoeletrico de 8,2. Além disso, A BthTX-II, bothropstoxina-II, apresenta baixa atividade fosfolipásica, ou seja, baixa atividade catalítica (Asp49-PLA<sub>2</sub> básicas) (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988).

A estrutura tridimensional da BthTX-II em comparação com outras fosfolipases revelou que o loop de ligação ao Ca<sup>2+</sup> é extremamente distorcido, além de apresentar alteração na região C-terminal que começa com configuração diferente, adotada próximo a tirosina (Tyr28) na cadeia principal, acarretando em um desvio importante desse looping, explicando o dímero alternativo na estrutura quaternária (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Gutierrez *et al.*, 1991; Pereira *et al.*, 1998; Correa *et al.*, 2006; Correa *et al.*, 2008). Dentre seus principais efeitos biológicos destacam-se a capacidade de induzir edema e miotoxicidade (Andriao-Escarso *et al.*, 2000), atuam durante a resposta inflamatória (Santos *et al.*, 2018), na agregação plaquetária (Andriao-Escarso *et al.*, 2002) e na regeneração tecidual (Raneia *et al.*, 2019).

De uma forma geral, as fosfolipases A<sub>2</sub> oriundas de peçonhas de serpentes contribuem para um elevado número de ações farmacológicas além de sua ação no envenenamento, incluindo a miotoxicidade, neurotoxicidade, hemólise, hipotensão, ação anticoagulante, edematogênica e efeitos na agregação plaquetária e inflamação. Porém as atividades biológicas das sPLA<sub>2</sub>, podem ser produzidas como consequência da atividade enzimática da mesma, ou através de uma interação direta da PLA<sub>2</sub> com seu ligante sem qualquer ativação catalítica. A atividade hidrolítica da enzima PLA<sub>2</sub> na membrana fosfolipídica, induz a liberação de ácidos graxos (FAs) e lisofosfolídeos (LysoPL) tendo como resultado os efeitos farmacológicos dentro das células, tais como danos de membrana, rompimento de proteína de membrana-limite e distúrbios funcionais da cascata celular, sendo que esses mecanismos podem exercer os diferentes efeitos

antitumorais já descritos na literatura (Kuruppu *et al.*, 2008; Bazaa *et al.*, 2009; Zouari-Kessentini *et al.*, 2013; Calderon *et al.*, 2014; Chaisakul *et al.*, 2014; Azevedo *et al.*, 2016; Silva, Lopes, Teixeira, Gimenes, Azevedo, *et al.*, 2018).

Os mecanismos moleculares envolvidos na ação atitumoral de PLA<sub>2</sub>s Asp49 e Lys49 de peçonhas de serpentes ainda não são totalmente compreendidos. Entretanto, estudos vêm demonstrando que estas PLA<sub>2</sub>s podem reduzir massa tumoral *in vivo*, inibir adesão e migração celular (Bazaa *et al.*, 2009), ativação das vias de morte celular (Azevedo *et al.*, 2016), liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela via MAPK/ERK, além de apresentarem ação citotóxica e genotóxica *in vitro* (Chen *et al.*, 2014; Silva, Lopes, Teixeira, Gimenes, Azevedo, *et al.*, 2018). Em adição, pode-se relatar que as PLA<sub>2</sub>s também exerceram papel importante tanto no ciclo celular (Prinholato Da Silva *et al.*, 2015), quanto nos receptores do tipo integrina que é de fundamental importância para a ação antitumoral dessas moléculas (Bazaa *et al.*, 2010).

Todas estas considerações nos permitem inferir a nítida e promissora utilização de peçonhas ofídicas para a identificação de novos compostos com ação antitumoral, seja pela complexidade das peçonhas ou pela diversidade de serpentes existentes. Portanto, esse estudo tem como objetivo avaliar a atividade antitumoral, antimetastática e antiangiogênica de uma PLA<sub>2</sub> (BthTX-II) isolada da peçonha de *B. jararacussu* sobre a inibição da transição epitélio mesênquima e angiogênese tumoral sobre células de câncer de mama altamente invasivo e metastático.

## 5. Objetivos

### 5.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi demonstrar o efeito antitumoral e antiangiogênico de uma fosfolipase A<sub>2</sub> da peçonha de *Bothrops jararacussu* (BthTX-II), bem como a inibição da Transição Epitélio-Mesênquima (EMT) sobre células tumorais de mama.

### 5.2. Objetivos Específicos

- ✓ Purificar a PLA<sub>2</sub>-BthTX-II do veneno de *B. jararacussu*
- ✓ Determinar o efeito da BthTX-II em linhagens de mama e avaliar ativação e indução das vias de morte causadas pela BthTX-II sobre células de câncer de mama triplo negativo,
- ✓ Avaliar a ação da BthTX-II sobre a proliferação, ciclo celular e a expressão de diferentes proteínas e genes pela técnica de qPCR;
- ✓ Verificar a atividade antimetastática da BthTX-II através dos ensaios de adesão, invasão e migração de células MDA-MB-231; bem como a expressão de genes e proteínas envolvidas nas vias de sinalização de metástase tumoral pela técnica de PCR em tempo real, além de verificar o potencial de ação da fosfolipase sob modelo cultura (3D) esferoides celulares;
- ✓ Avaliar ação da BthTX-II sobre proteínas e genes com ação na transição epitélio-mesênquima das células MDA-MB-231;
- ✓ Analisar a modulação da expressão de genes e proteínas que atuam como receptores de membrana e estão envolvidos com o processo de angiogênese tumoral
- ✓ Analisar a atividade antiangiogênica através da inibição da formação de vasos (*in vitro*) e pela quantificação dos níveis de VEGF,

- ✓ Avaliar ação da BthTX-II sobre a inibição da formação de vasos pelo modelo de anel de aorta de camundongos (modelo *ex vivo*);
- ✓ Avaliar a atividade da BthTX-II sobre migração e invasão de células HUVEC e sua atividade sobre angiogênese *in vitro*;
- ✓ Avaliar ação BthTX-II sobre a angiogênese tumoral através da co-cultura de células MDA-MB-231 e HUVEC em diferentes tempos;
- ✓ Avaliar ação da BthTX-II sob inibição da invasão em co-cultura de células MDA-MB-231: HUVEC em *transwell*;
- ✓ Avaliar a angiogênese tumoral e evolução câncer *in vivo*, através do método *Chick Chorioallantoic Membrane* (CAM) e monitorar ação terapêutica da PLA<sub>2</sub>

## 6. Metodologia

### 6.1. Peçonha:

A peçonha bruta (PB) de *Bothrops jararacussu* foi obtida a partir de espécimes mantidas no Centro de Extração de Toxinas Animais, Ltda. - CNPJ: 08.972.260 / 0001-30, Morungaba, SP, Brasil. Este serpentário obteve comprovação de registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) e uso de recursos naturais renováveis (cadastro n ° 2087163).

### 6.2. Purificação da fosfolipase A<sub>2</sub> Asp-49-BthTX-II

A fosfolipase A<sub>2</sub> denominada, BthTX-II foi purificada da peçonha de *Bothrops jararacussu* como previamente descrito por (Honsi-Brandeburgo *et al.*, 1988) com pequenas modificações. A peçonha bruta (200 mg) foi ressuspensa em 2 mL de tampão (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) bicarbonato de amônio 50 mM (pH 7,8) e centrifugada a 3000 xg por 10 min a 4 °C. O sobrenadante recuperado foi aplicado à resina CM-Sepharose *Fast Flow* (Amersham Bioscience, Brasil) previamente equilibrada com o mesmo tampão e frações de 1 mL / tubo foram coletadas a 6,5 mL / h (vazão pela fração de coletores Radifrac Amersham Bioscience, Brasil), e monitorado por espectrofotômetro Ultrospec 1000 (Amersham Pharmacia Biotech, Brasil) por absorbância a 280 nm. Em seguida, verificou-se a homogeneidade das frações contendo a fosfolipase A<sub>2</sub>, BthTX-II pela coluna de cromatografia de fase reversa RP-HPLC C18 (GE Healthcare-Life Sciences, Brasil). As amostras foram liofilizadas e armazenadas a -20 °C (Dubbs, 1966).

### 6.3. Dosagem Proteica

As frações obtidas das diferentes cromatografias foram quantificadas através do método estabelecido por Bradford (1976) (Bradford, 1976) e confirmadas pelo

equipamento BioDrop (Analítica). Brevemente, para o método de Bradford foi construída uma curva padrão de soroalbumina bovina (1mg/mL) e as concentrações das proteínas foram realizadas em triplicata e a absorbância lida a 595nm (Multiskan GO ThermoScientific, EUA). A concentração das amostras foi determinada em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  a partir de cálculos de regressão linear baseados em valores obtidos na curva padrão utilizando a soroalbumina bovina como proteína padrão, somente admitindo valores para  $r^2 > 0,98$ .

#### **6.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE)**

A homogeneidade das amostras contendo a proteína BTHTX-II foi avaliada em gel de poliacrilamida a 12,5% (m/v) em condições redutoras (LAEMMLI, 1970). Brevemente, o sistema de SDS-PAGE descontínuo foi construído com um gel de empilhamento a 3%, contendo TRIS-HCl 0,5M (pH 6,8) e SDS a 0,1% (m/v) e um gel de separação a 12% com TRIS-HCl 2,0M (pH 8,8) e SDS a 0,1% (m/v), mantendo a proporção de 0,8:30 de bis:acrilamida. Todos os géis foram preparados no sistema de eletroforese HOEFER GE 260. As amostras foram preparadas em um tampão de TRIS-HCl 0,06M pH 6,8, SDS 2% (m/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 20% (v/v), azul de bromofenol 0,005% (m/v) e glicerol 10% (v/v). Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 100°C por 5min e aplicadas no gel para corrida contendo tampão TRIS 0,025M, Glicina 0,192M e SDS 0,1% (m/v) (pH 8,3). Ao final o gel foi corado em uma solução de Coomassie blue R250 0,1% (m/v) em água, ácido acético 10% (v/v) e metanol 50% (v/v) e descorado em solução de ácido acético 7% (v/v) e etanol 30% (v/v). O padrão de massa molecular utilizado era composto da mistura das seguintes proteínas: fosforilase b, 98 kDa; albumina bovina 62 kDa; ovoalbumina 49 kDa; gliceraldeído-3-fosfato

desidrogenase 38 kDa; anidrase carbônica 28.1 kDa; tripsinogênio 24 kDa; inibidor de tripsina 17,4 kDa;  $\alpha$  lactoalbumina; 14,4 kDa.

## **6.5. Animais**

Camundongos da linhagem Balb-c (20-30 g) foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Uberlândia mantidos em condições padrões de temperatura 25°C, umidade relativa do ar de 60-65%, ciclo de 12 horas de luz/noite, dieta e água *ad libitum*. Os procedimentos realizados com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA, número do protocolo 130/15) da Universidade Federal de Uberlândia e está em acordo com os princípios éticos de experimentação animal aprovados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Para análise em embriões de galinha, não foi necessária aprovação pelo Comitê de ética, regulamentado pelas leis brasileiras. Os ovos fertilizados foram doados pela empresa BRF - S.A, e a doação e utilização foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal interno da empresa (sem número).

## **6.6. Cultura de células**

As linhagens de câncer de mama triplo negativo humana (MDA-MB-231), célula humana não tumoral de mama (MCF 10A) e célula umbilical endotelial/vascular humana (HUVEC) foram obtidas do banco de células da American Type Culture Collection (ATCC). As células foram mantidas em temperatura controlada de 37 °C em uma incubadora umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As células MDA-MB-231 foram cultivadas em meio IMDM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 100U/mL de Penicilina e 100mg/mL de Estreptomicina. As células MCF-10A foram mantidas em meio DMEN-F12 suplementado com 10% de SFB, 100µg/mL de Fator de Crescimento



Epidermal (EGF), 1mg/mL de Hidrocortisona, 10mg/mL de Insulina, 100U/mL de penicilina e 100mg/mL de Estreptomicina e 1mg/mL de toxina colérica. As células Endoteliais Vasculares de cordão Umbilical humano (HUVECs) foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, 2mM de L-glutamina, 2mM de piruvato de sódio, 1mM de aminoácidos não essenciais, 100U/mL de penicilina e 100mg/mL de estreptomicina.

### **6.7. Ensaio de citotoxicidade por MTT**

Células MDA-MB-231 e MCF 10A ( $3 \times 10^4$  células/poço) foram plaqueadas em placas para cultivo celular em poliestireno com 96 poços e mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para melhor adesão à placa. Após 24 horas, foi adicionado um novo meio contendo concentrações decrescentes de BthTX-II (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,560 µg/mL) ou apenas meio nos grupos de controle negativo e as placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após o tratamento as células foram incubadas com o reagente de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (5mg/mL, 20µL/poço) por 3 horas a 37 °C, após esse tempo, foram adicionados 100µl de PBS contendo 10% de SDS e 0,01M de HCl em cada poço para a completa dissolução dos cristais de Formazan formados a partir do consumo do reagente MTT pela enzima mitocondrial (S.D). A absorbância foi lida após 18 horas a 570nm em espectrofotômetro (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer – Thermo Scientific, USA).

### **6.8. Ensaio de Apoptose com Anexina V / Iodeto de Propídeo**

O ensaio para avaliar a morte celular por apoptose foi realizado através do Kit de Apoptose (BD Biosciences) seguindo as orientações dos fabricantes. Brevemente, as células MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 24 poços na quantidade de  $2 \times 10^6$

células/poço. Após 18 horas de adesão das células, estas foram tratadas com BthTX-II (10 e 50 µg/mL) por 24 horas. Decorrido o tempo de tratamento as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS 1X gelado, ressuspensas em tampão de ligação e contadas em câmara de Neubauer. As células foram divididas em 4 grupos, nos quais continham apenas células sem marcação; células coradas com 2µl de FITC-Anexina V; células coradas com 2µl de PI-Iodeto de Propídeo e células com a dupla marcação coradas com FITC-Anexina V e PI-Iodeto de Propídeo. Estas foram incubadas no escuro por 10 minutos e as análises foram realizadas com auxílio do Software FlowJo - BD Accuri C6 (Biosciences, CA, USA).

### **6.9. Expressão gênica pelo método de PCR em tempo real (RT-PCR)**

Células MDA-MB-231 ( $5 \times 10^6$ ) foram plaqueadas em garrafas de 25cm<sup>3</sup> e posteriormente tratadas com a BthTX-II (50µg/mL) por 24 horas. As células foram mantidas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e 37 °C. Após o tratamento, o RNA foi extraído utilizando o Kit Tri-Reagent Sigma®. O pellet de células foi extraído utilizando 1mL de Trizol para uma quantidade de ( $5-10 \times 10^6$ ) células e posteriormente, 200µL de clorofórmio foram adicionados em cada microtubo contendo as células, agitados vigorosamente por 15 segundos e centrifugados a 13.000rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, 500µL de isopropanol foram adicionados ao sobrenadante e centrifugados novamente a 13.000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 1mL de etanol 75% (v/v), sendo novamente centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos. Após centrifugação o RNA foi ressuspensão com água RNase *free* e quantificado no BioDrop (BioDrop – Inglaterra). Valores de absorvância acima de 1,7 (280 e 260nm) indicaram a pureza do RNA.

O cDNA foi construído a partir do RNA extraído utilizando o Kit GoScript Reverse Transcription System (Promega®), seguindo as orientações do fabricante. Primeiramente preparou-se o Mix 1 contendo 2µg de RNA e 2 µl de cada primer, que foram incubados por 5 minutos a 70 °C e 5 minutos no gelo. Em seguida, foi preparado o Mix 2 contendo Tampão, MgCl<sub>2</sub>, RNAsin, mix para PCR e Transcriptase Reversa. Esta mistura 2 foi incubada por 5 minutos a 25 °C e 60 minutos a 42°C. O cDNA foi mantido em -20 °C.

A expressão gênica foi analisada a partir da técnica de PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR) utilizando uma biblioteca de primers comercial contendo diferentes genes envolvidos com diferentes processos celulares (Human Cancer Pathway Primer Library - GO-GenOne; Brazil; <http://www.genone.com.br>). O PCR quantitativo foi realizado em triplicata utilizando o Kit Master Mix–Sybr Green (LGC Biotechnology; Brazil) de acordo com o fabricante. Em resumo, foram adicionados ao kit de reação 2µL de cDNA e 0,1µM de cada primer, os parâmetros determinados para os ciclos seguiram o seguinte padrão seguindo orientações do fabricante: 50 ciclos a 95 °C de 10 segundos e 58 °C de 45 segundos. Os dados obtidos do RT-PCR foram padronizados de acordo com o método Comparative Threshold Cycle (CT), segundo Livak and Schmittgen, 2001. Os dados foram normalizados utilizando β-actina e GAPDH como controles endógenos da reação e os resultados foram expressos em *Fold Changes* (expressão dos genes do grupo tratado com BthTX-II comparado com grupo controle, apenas meio de cultura IMDM), estes valores foram convertidos para a representação gráfica ( $-1/\Delta\Delta CT$ ).

#### **6.10. Ensaio de migração pela técnica de cicatrização da ferida “Wound healing”**

A inibição da migração das células MDA-MB-231 e HUVEC foram analisadas pela técnica de *Wound healing* como descrita por Jung (2013) (Jung *et al.*, 2013), com

pequenas modificações. Brevemente, as células foram semeadas a  $4 \times 10^6$  células/poço em placas de 12 poços. Após 24 horas foi realizado um corte na monocamada das células com o auxílio de uma ponteira de  $10 \mu\text{L}$ , o meio foi descartado e trocado por um novo meio contendo ou não a fosfolipase. As células aderidas foram então tratadas com a fosfolipase (BthTX-II 10 e  $50 \mu\text{g/mL}$ ) por 24 horas e o fechamento da fenda foi fotografada em microscópio ótico invertido (Nikon Eclipse TS100) e fotografada em câmera Nikon TS1000 (na magnitude de 10X) e posteriormente calculado o fechamento da fenda com auxílio software ImageJ utilizando a fórmula abaixo.

$$\% \text{ fechamento da fenda} = \frac{At \ 0h - At \ 24h}{At \ 0h} * 100 \ (F1)$$

At= area total

### **6.11. Ensaio de Inibição da adesão celular sob diferentes substratos**

Células MDA-MB-231 e HUVEC ( $3 \times 10^4$  células/poço) foram pré-incubadas com diferentes concentrações da fosfolipase (50; 25; 12,5; 10; 6,25; 5; 3,125 e  $2,5 \mu\text{g/mL}$ ) por 30 min a  $37^\circ\text{C}$ . Após a incubação as células foram semeadas em placas de 96 poços sob diferentes componentes da matriz extracelular, como Colágeno IV (10 mg/mL em 0.1 M de Ácido Acético), Fibronectina (10 mg/mL em PBS), ou Matrigel (10 mg/mL em PBS). Células cultivadas em placas sem nenhum componente da matriz extracelular foram utilizadas como controle. As células que não aderiram foram removidas com PBS 1X e as células aderidas foram mensuradas pelo método de MTT, como descrito no item 6.7

### **6.12. Ensaio de migração celular em *Transwell***

O ensaio de migração celular foi realizado utilizando membrana de policarbonato (*Transwell*) para placas de múltiplos poços com poros de 8µm (Greiner Bio-One, Suíça). Neste ensaio as células MDA-MB-231(1x10<sup>5</sup> células) foram pré-incubadas em meio IMDM isento de Soro Fetal Bovino, contendo BthTX-II (10 e 50µg/mL) por 30 minutos a 37 °C. Após esta incubação, as células (1x10<sup>5</sup> célula/*transwell*) foram semeadas na parte superior do *transwell* e no compartimento inferior foi adicionado apenas o meio contendo 10% de SFB como quimioatrativo para as células.

### **6.13. Ensaio de Invasão celular e co-cultura**

Para o ensaio de invasão, foram semeadas células MDA-MB-231 (2,5 x 10<sup>5</sup>) na câmara de invasão superior (BD BioCoat Matrigel™) contendo membrana PET com poro de 8,0 µm, na presença de meio IMDM com ausência de SFB e no compartimento inferior foi adicionado meio com 10% de SFB como quimioatrativo para as células. Esse mesmo ensaio foi realizado em membrana PET de 4,0 µm para o sistema de modelo de co-cultura a fim de separar as células HUVECs e MDA-MB-231 nos diferentes compartimentos. Uma hora antes da co-cultura, HUVECs (5 × 10<sup>4</sup>) em 500 µl de RPMI foram cultivadas em placas de 24 poços com ou sem revestimento de Matrigel (BD Biosciences), número equivalente de células MDA-MB-231 foi semeado na câmara superior de uma inserção *transwell*, que foi então colocada diretamente no topo da placa de 24 poços contendo as HUVECs.

Ambos os ensaios foram efetuados na presença ou ausência de fatores de crescimento (EGF e bFGF). O tratamento com BthTX-II (10 e 50 µg / ml) ou meio foram adicionados nos poços superiores o que permitiu a invasão após 24h. As células não

invasoras no lado superior foram removidas com um aplicador com ponta de algodão e as células na superfície inferior da membrana foram coradas com cristal de violeta. Após coloração e fixação as células foram contadas manualmente, em cinco campos diferentes da membrana, com ajuda de um microscópio (EVOS <sup>â</sup>, AMG). O experimento foi realizado em triplicata. Controles positivos e negativos foram representados por células em meio completo (com SFB) e em meio sem SFB, respectivamente.

#### **6.14. Ensaio tridimensional (3D) em Matrigel – formação de esferóides**

O ensaio de crescimento 3D de células MDA-MB-231 e MCF10A em Matrigel<sup>TM</sup> foi realizado segundo Amir (2016) com algumas modificações. Brevemente, uma placa de 96 poços foi revestida com 50µl de Matrigel e incubada durante 30 minutos a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>. Após solidificação do Matrigel<sup>TM</sup>, (3 x 10<sup>4</sup>) células suspensas em 100µL de meio completo mais 2% de Matrigel foram adicionados aos poços. As células tratadas com diferentes concentrações de BthTX-II (1, 10 e 50 µg/ml) por 7 dias a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Ao final do experimento, as células foram analisadas e a formação de células esferóides foi fotografada com aumento de 10X (Nikon Eclipse TS100) (Amir *et al.*, 2016).

#### **6.15. Ensaio de Proliferação Celular**

Células MDA-MB-231 (2x10<sup>4</sup> células / por poço) foram semeadas em placa de 24 poços por quatro dias a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>. As populações celulares foram normalizadas em meio isento de soro por 24 horas, após essa etapa o meio foi aspirado e substituído por um meio contendo BthTX-II (1, 10, 25 e 50 µg / mL). Para as células controle positivo foi utilizado meio IMDM com SFB a 10%, enquanto para as células do controle negativo o meio IMDM estava sem suplementação de SFB. (Todo meio e tratamento foi refeito a cada 24 horas). Após 72 horas, 30 µl de MTT (5 mg / mL) (Sigma

M2128, EUA) foram adicionados a cada poço e as placas foram incubadas por 3 horas, a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>. Cristais de formazan foram dissolvidos em 150 µl de DMSO por 15 minutos sob leve agitação. A absorbância foi lida a 570 nm utilizando um leitor de microplacas (Molecular Devices, Menlo Park, CA, EUA). Os espaços em branco devem produzir valores de  $0 \pm 0,1$  O.D. unidades. Os valores médios das leituras em triplicata foram determinados e o valor médio do branco foi subtraído.

#### **6.16. Ensaio de citotoxicidade por LDH**

A citotoxicidade induzida por BthTX-II foi também avaliada pela liberação de LDH no meio de cultura. Células MDA-MB-231 foram semeadas em placas de 96 poços (10<sup>6</sup> células / poço) e incubadas com BthTX-II (50 / mL) durante 24 horas. Após incubação, a LDH liberada no meio foi mensurada com o kit de ensaio de citotoxicidade LDH (Cayman Chemical Company) de acordo com as instruções do fabricante. As absorbâncias foram lidas a 490 nm (Multiskan GO Thermo Scientific, EUA). A atividade de LDH foi expressa como 1 Unidade (U) de atividade de LDH definida com base na quantidade de enzima que catalisa a conversão de lactato em piruvato para gerar 1,0 mol de NADH e H<sup>+</sup> para catalisar a redução do sal de tetrazólio a 37 °C (µmol / min / mL). O formazan produzido é proporcional à quantidade de LDH liberada no meio de cultura resultante da citotoxicidade.

#### **6.17. Ensaio de autofagia**

Os vacúolos autofágicos foram marcados com monodansilcadaverina (MDC, Sigma Brasil) com pequenas modificações previamente descritas por Yan (2007) (Yan *et al.*, 2007). Inicialmente, as células (MDA-MB-231 e MCF10A) foram plaqueadas em placas de 24 poços com lâminas estéreis durante a noite, seguido por tratamento com BthTX-II (50 µg / mL) durante 24 horas. Células não tratadas foram usadas como controle

negativo. Após o tratamento, as células foram marcadas com 0,05 mM de MDC em IMDM, incubadas a 37 °C durante 30 minutos. Após a remoção da MDC, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% durante 15 minutos a 37 °C. As amostras foram observadas usando microscopia de fluorescência (Zeiss LSM510, Alemanha). Com o auxílio do software Image J (Bethesda, MD, EUA), quatro campos microscópicos selecionados aleatoriamente com aumento de 200x foram usados para quantificar a intensidade da fluorescência, que representa os níveis relativos de autofagia celular. Os valores médios de fluorescência foram calculados a partir de três replicatas biológicas.

#### **6.18. Análise do ciclo celular**

Células MDA-MB-231 ( $2 \times 10^5$  células / mL) foram semeadas em placas de 12 poços e depois foram estimuladas a entrar em fase G0 adicionando meio de cultura sem SFB durante 24 h. Em seguida, as células foram re-estimuladas com novo meio IMDM suplementado com SFB a 10% com objetivo de todas saírem da fase G0 ao mesmo tempo. Após 24h de estímulo, as células foram tratadas com duas concentrações diferentes de BthTX-II (10 e 50 µg/mL) e após 24 horas de tratamento, as células foram tripsinizadas, lavadas em PBS 1X e coletadas. O sedimento foi fixado em etanol 80% e armazenado a -20 durante a noite; as células fixadas foram lavadas com PBS 1X e tratadas com RNase (sigma-Aldrich, Brasil) e, em seguida, as células foram coradas com iodeto de propídio (PI) por 15 min (Sigma-Aldrich, Brasil). Posteriormente, as células foram submetidas contagem por citometria de fluxo (BD Accuri C6, USA) e análise dos dados foi realizada utilizando o software FlowJo.10 (Treestar Inc., San Carlos, CA).



### **6.19. Western blotting**

Células MDA-MB-231 ( $1 \times 10^6$  células/poço) foram plaqueadas em placas de 6 poços em triplicata e incubadas durante a noite. Após este tempo, as células foram incubadas com BthTX-II (10 e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 24h. Após o tratamento as células foram lavadas com PBS gelado e coletadas em tampão de solubilização (Complete Lise-M, sem EDTA e cocktail inibidor de protease, Roche Diagnostics, EUA) e centrifugadas a  $12.000 \times g$  por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Cerca de 10  $\mu\text{g}$  do extrato proteico foi submetido a SDS-PAGE 10% (v/v) e posteriormente as proteínas transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond C, Amersham Biosciences) de acordo com Towbin (1979) (Towbin *et al.*, 1979). As membranas foram bloqueadas por 1 hora com TBS-T (0,02 M Tris-HCl (pH 7,5), 0,15 M NaCl e 0,1% Tween-20) contendo 5% de leite com baixo teor de gordura e transferidas por 2 h usando anti-Vimentina SAB4300676 (Sigma-Aldrich, Brasil) a 1: 500 e beta Actin policlonal anticorpo-BA3R a 1: 200 (ThermoFisher Scientific, Brasil), lavados três vezes em TBS-T e PBS, e incubados por 60 min com o anticorpo secundário IgG anti-coelho conjugado a HRP ( diluição 1: 2000 RAB0151 Sigma-Aldrich); após este passo, os sinais de imunoreatividade foram visualizados utilizando o kit quimioluminescente Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent e foram detectáveis em Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare Life Sciences). As intensidades das bandas de proteínas foram quantificadas usando o software ImageJ, e a relação banda-controle específica foi analisada.

### **6.20. Expressão de Integrinas em células**

A análise de expressão e reconhecimento de integrinas na superfície das células MDA-MB-231 foi realizada utilizando-se anticorpos anti-integrina em citometria de fluxo. Células MDA-MB-231 ( $3 \times 10^5$ ) foram plaqueadas e posteriormente as células

aderidas foram tratadas com BthTX-II (50 µg/mL) ou meio (grupo controle) durante 2 horas a 37 em 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram lavadas com PBS / BSA a 0,5% e incubadas com anticorpos monoclonais anti- α2β (CD49b), anti-β1 (CD29) e anti- αVβ3 (CD51 / CD61) (Ambriex, Brasil) por 30 minutos a 4°C. Todas as suspensões de células foram também incubadas com os anticorpos monoclonais de controle de isotipo marcados com fluoresceína. As amostras foram analisadas com auxílio do software da BD Accuri C6 Flowjo (BD Accuri C6 - Biosciences, CA, USA).

### **6.21. Ensaio de formação de vasos em células HUVEC (Angiogênese *in vitro*)**

Para o ensaio de formação de vasos *in vitro*, inicialmente placas de 24 poços foram previamente revestidas com 50µl de Matrigel (Corning® Matrigel® Matrix, USA) por 40 minutos. As células HUVEC (5x10<sup>5</sup>cel/poço) foram pré-incubadas com a fosfolipase BthTX-II (10 e 50 µg/mL) por 30 minutos a 37°C em meio RPMI suplementado com bFGF (10 ng/mL). Em seguida, as células foram semeadas nos poços das placas contendo Matrigel™. Estas foram mantidas a 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 18 horas, antes de ser analisada a formação dos vasos e fotografados em um microscópio invertido em uma magnitude de 10X (Nikon Eclipse TS100).

### **6.22. Dosagem de VEGF no sobrenadante de células HUVEC**

Os níveis de VEGF foram quantificados no sobrenadante das células HUVEC obtidos após o ensaio da formação de vasos *in vitro* (item 6.21). Essa dosagem foi realizada utilizando um Kit CBA para proteínas celulares (BD–EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, foi construída uma curva padrão com diferentes concentrações de VEGF (2500, 1250, 625, 312,5, 156, 80, 40, 20 e 10pg/mL). Em seguida, 50µl do *Mix de Beads* foram adicionados (Diluent Beads e Capture Beads) às amostras por 1 hora em temperatura ambiente e posteriormente, 50µL do *Mix PE*

*Detection Reagent*, as quais foram incubadas por mais 2 horas em temperatura ambiente. Após a incubação as amostras foram lavadas com 500µL de *Wash Buffer* e centrifugadas a 200 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o pellet de células ressuspendido em 300 µL de *Wash Buffer*. As amostras foram submetidas ao Citômetro de fluxo e analisadas com o auxílio do software (Cytoflex - Beckman Coulter, CA, USA).

### **6.23. Ensaio de anel aórtico – modelo de angiogênese *ex vivo***

O ensaio para avaliar a angiogênese em modelo *ex vivo* será realizado com adaptações segundo (Baker et al., 2011). Brevemente, os fragmentos aórticos (1 – 1,5 mm) removidos de camundongos Balb-c machos (6 semanas – aproximadamente 30 gr) e lavados em PBS 1X gelado suplementado com penicilina-estreptomicina 1%. Os fragmentos aórticos foram plaqueados em camada de Matrigel, previamente gelatinizados em placas específicas, culturesslides 8-poços (BD-Pharmingen) e incubados em meio RPMI suplementado com fator de crescimento bFGF (10 ng/mL) e EGF (20 ng/mL) por 48 horas antes de iniciar o tratamento com BthTX-II (10 e 50 µg/mL). Após 48 horas os fragmentos aórticos foram tratados por 9 dias com a a PLA2 com intervalos de tratamento de 1 dia. Ao final deste período, os fragmentos dos anéis aórticos foram analisados para avaliar os brotamentos celulares formados a partir dos fragmentos aórticos e fotografados utilizando um microscópio óptico invertido a 10X (Nikon Eclipse TS100) e posteriormente corados com BS1-Lectin e DAPI.

### **6.24. Co-cultura de células endoteliais humanas (HUVEC) e células de câncer mama (MDA-MB-231)**

O ensaio de co-cultura em 3D foi realizado segundo Swathi Swaminathan (2017) com algumas modificações. Anteriormente células HUVEC foram marcadas com corante vermelho (BD Pharmingen™ MitoStatus Red) e células MDA-MB-231 marcadas com

corante verde CFSE - Cell Labeling Abcam, a fim de melhor visualizar a interação entre elas. Placas foram previamente revestidas com 50µl de Matrigel (Corning® Matrigel™, USA) solidificadas por 40 minutos, 1200 Células HUVEC, foram adicionadas nos poços e incubadas até a formação de rede de vasos (túbulos). Em outra placa, após 12 h, esferóides recém-formados de células MDA-MB-231, (segundo metodologia 3D acima), foram transferidos e cultivados por 3 dias, a rede de vasos de células endoteliais recém-formados em matrigel™. Essa rede de vasos endoteliais co-cultivadas com esferóides de mama 3D, permite interação de um bloco de construção importante para estudar interações célula-célula fisiologicamente relevantes (Swaminathan *et al.*, 2017). Para esse ensaio foi utilizado na razão 1:1 entre células tumorais e células endoteliais (números exatos: 1200 células tumorais, 1200 células endoteliais) em meio RPMI a fim de avaliar a interação entre células tumorais com o endotélio. (Swaminathan *et al.*, 2017).

#### **6.25. Crescimento e angiogênese tumoral *in vivo* pelo método de *Chick Chorioallantoic Membrane* (CAM)**

O ensaio CAM foi realizado conforme descrito (Chen *et al.*, 2013) com algumas modificações. Para este ensaio foram utilizadas 25 matrizes de ovos de galinha fertilizados. A partir do 3º dia de vida do embrião, 2 mL de albumen foram removidos e depois incubados a 37,5 ° C. No 9º dia de incubação, 5x10<sup>6</sup> células de MDA-MB-231 incubadas com matrigel (9,5 mg/mL, Corning, EUA) em um volume total de 30 µL foram injetados na CAM de embriões de aves (n = 3 por grupo). No 12º dia após a fertilização (dpf) foi feita uma abertura na casca do ovo e início do tratamento com BthTX-II (10 e 50 µg/ml), sendo posteriormente coberta com parafilme. Durante os 7 dias de tratamento, a viabilidade dos embriões de galinha foi avaliada diariamente, como um pré-requisito

para completar o experimento. Ao término do experimento, os embriões foram sacrificados pelo médico veterinário e os tumores retirados e fotografadas.

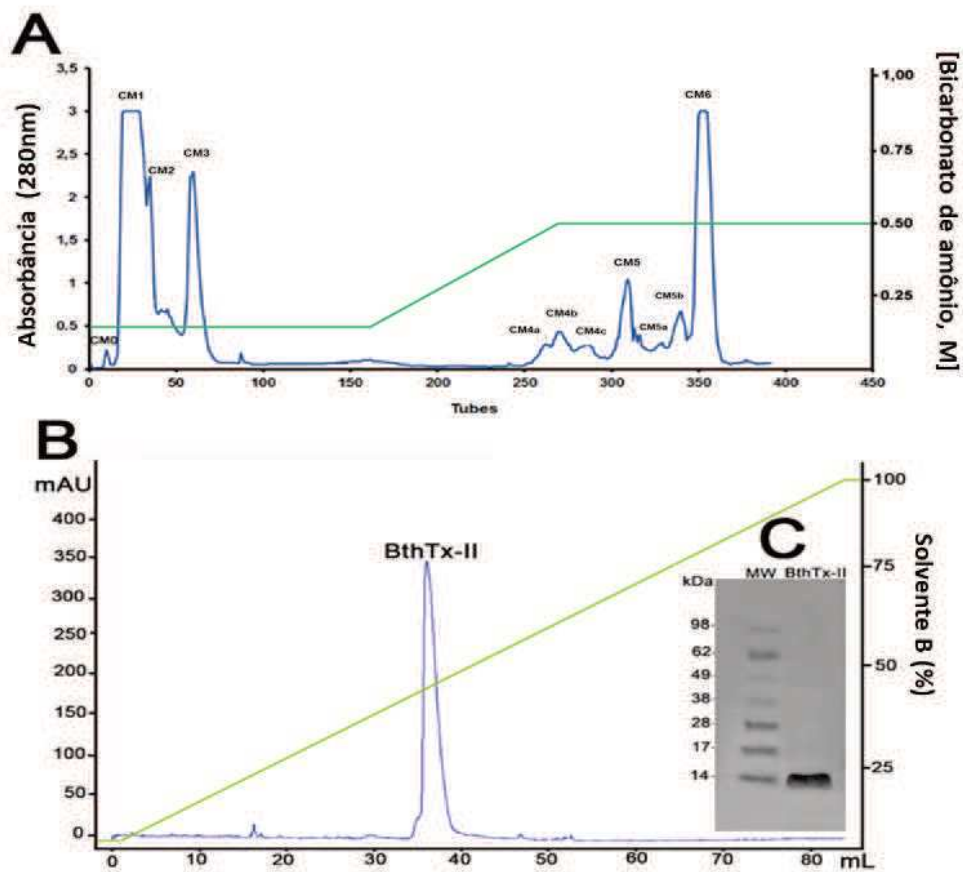
### **6.26. Estatística**

Os experimentos foram realizados em triplicatas em três experimentos independentes e os resultados foram expressos em  $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$  As diferenças entre os grupos de tratamento e controle foram analisados pelo teste Student's t-test (Unpaired or Nonparametric test, assumindo uma distribuição normal Gaussiana) ou pelo teste 1 ANOVA, e nos casos em que a comparação foi feita com duas ou mais variáveis foi realizado o teste 2 ANOVA; quando possível foram realizados o pós-teste Bonferroni post-test, com o auxílio do software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (\*\*) e  $p < 0,001$ (\*\*\*).

## 7. Resultados

### 7.1. Isolamento da PLA<sub>2</sub> Asp49- BthTX-II

Para avaliar os efeitos antitumoral e antimetastático da BthTX-II em células MDA-MB-231, bem como avaliar a angiogênese tumoral em células HUVEC, esta proteína foi primeiramente purificada da peçonha de *B. jararacussu* por cromatografia em CM Sepharose, resultando em 6 frações (CM1 a CM6) (Figura 5A). A homogeneidade da PLA<sub>2</sub>-BthTX-II (fração CM-5) foi confirmada por cromatografia em fase reversa (RP-HPLC) C18 (figura 5B) e posteriormente por SDS-PAGE (Figura 5C), revelando a presença de uma banda única na faixa de 14kDa, correspondente a massa molecular da BthTX-II (Homsí-Brandeburgo *et al.*, 1988).



**FIGURA 5: PURIFICAÇÃO DA FOSFOLIPASE A2 BHTX-II.** **A)** Cromatografia de troca iônica em resina CM-Sepharose *fast flow* equilibrada com tampão fosfato de sódio (0,05M) E NaCL (0,2M). A eluição ocorreu com NaCl (0,35M a 0,7M) em um fluxo de 12,0ML/H A 25°C. **B)** Cromatografia de fase reversa RP-HPLC C18. **C)** PAGE-SDS 12,5% com a fosfolipase BthTX-II e padrão de massa molecular: fosforilase b, 98,0 kDa; albumina bovina 62 kDa; ovoalbumina 49 kDa; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 38 kDa; anidrase carbônica 28.1 kDa; tripsinogênio 24 kDa; inibidor de tripsina 17,4 kDa;  $\alpha$  lactoalbumina; 14,4 kDa

## 8. Efeito antitumoral da BthTX-II

### 8.1. BthTX-II induz morte celular em células de câncer de mama

A BthTX-II nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,560 µg/mL reduziu a viabilidade celular em células MDA-MB-231 de uma maneira dose dependente (Figura 4A), além disso, induziu citotoxicidade em cerca de 50% nas concentrações mais altas. Curiosamente, nas mesmas concentrações, BthTX-II não afetou de forma significativa a viabilidade de células MCF10A não-tumorigênicas. A BthTX-II apresentou citotoxicidade inferior a 50% para ambas as células de mama, e dessa forma não foi possível determinar o IC50.

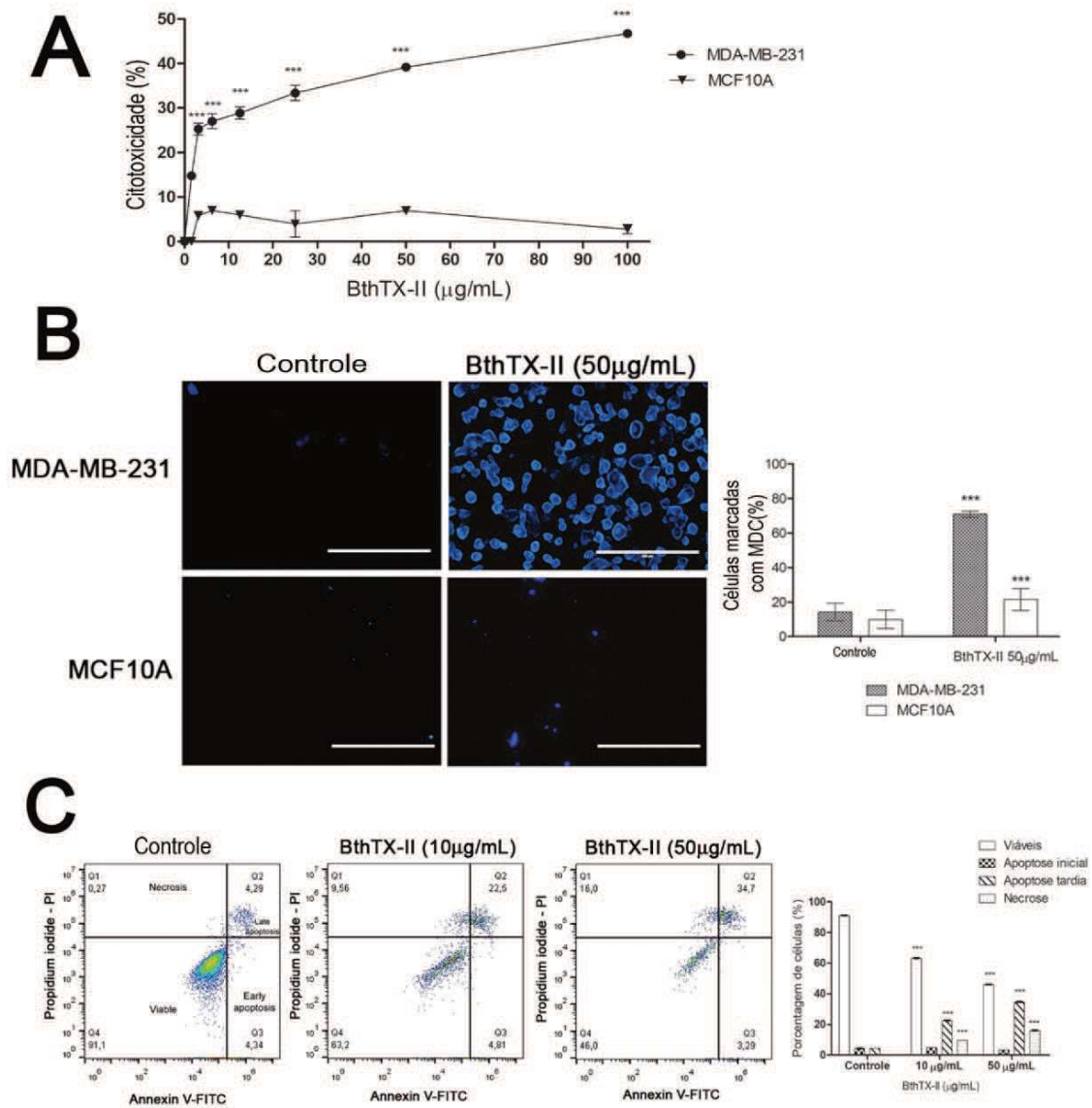
A PLA<sub>2</sub> BthTX-II (50 µg/mL) induziu morte celular por autofagia em aproximadamente 70% das células MDA-MB-231 e cerca de 30% nas células MCF10A (Figura 4B). A BthTX-II (10 e 50 µg /ml) também induziu apoptose inicial (4,81% e 3,29%); apoptose tardia (22,5% e 34,7%) e necrose (9,56% e 16%) nas células MDA-MB-231, respectivamente quando comparado às células controle (Figura 4C).

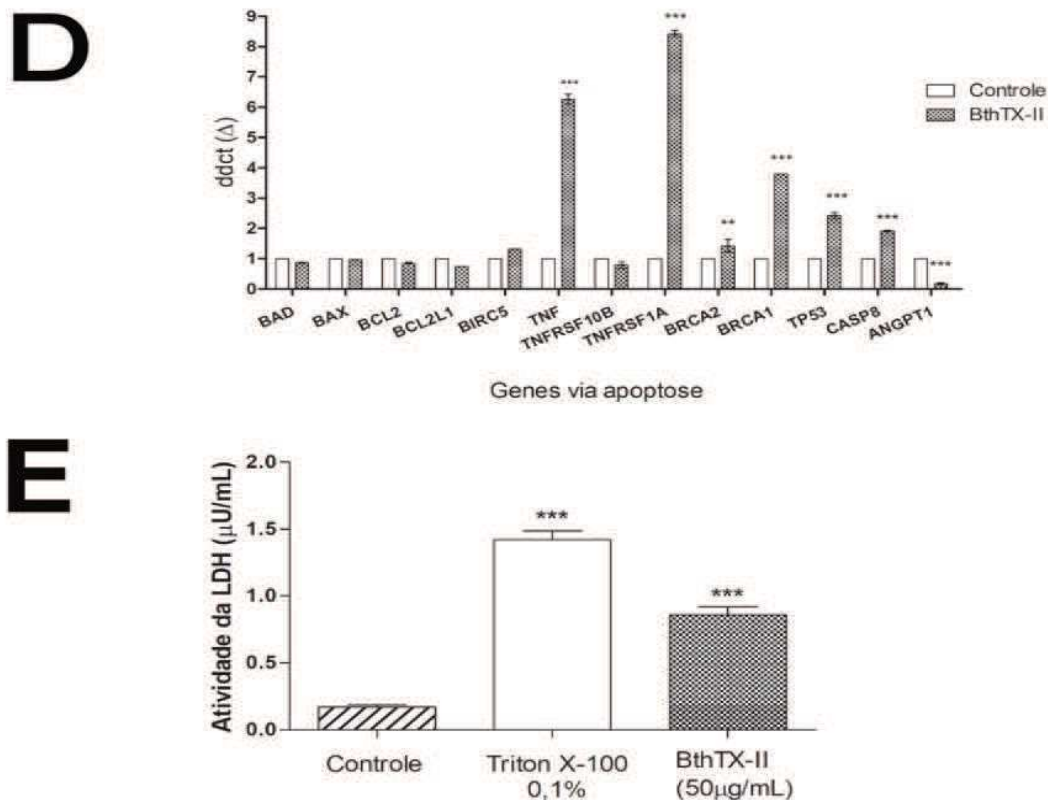
BthTX-II (50 µg/mL) foi capaz de modular a expressão de diferentes genes envolvidos na via intrínseca (*BAD*, *BAX*, *BCL2* e *BCL2L1*) e extrínseca da apoptose (*TNF*, *TNFRSF10B*, *TNFRSF1A* e *Caspase 8*) (Figura 4 D). Os resultados mostraram que os genes *TNF* e *TNFRSF1A* foram aumentados em 6,26 vezes e 8,42 vezes, respectivamente acima do controle. Além disso, os genes supressores de tumor *BRCA1* e *BRCA2* foram estimulados pelo tratamento com BthTX-II a 3,79 e 1,42 vezes. BthTX-II regulou positivamente a expressão dos genes *CASP8* / *TP53* em 1,91 e 2,42 vezes, respectivamente. O gene *MDM2* (E3 ubiquitina-proteína ligase) e *ANGPT1* (fator pró-angiogênico) foram reprimidos em 1,56 e 5,88 vezes, respectivamente. No entanto, quando comparado ao controle, o tratamento com BthTX-II não alterou



significativamente a expressão de alguns genes envolvidos na via de sinalização da apoptose, a saber, *BAD*, *BAX*, *BCL2*, *BCL2L1*, *BIRC5*, *TNFRSF10B*.

Finalmente, com objetivo de elucidar mais uma ação da PLA<sub>2</sub> sobre a morte celular, foi observado a liberação de 0.8 U $\mu$ mL de LDH (lactato desidrogenase) no sobrenadante de células MDA-MB-231 após tratamento com BthTX-II (50  $\mu$ g/ml) por 24 horas, quando comparadas com células tratadas com Triton X-100 que liberaram 1.5 $\mu$ UmL e com as células não tratadas (Figura 4 E).





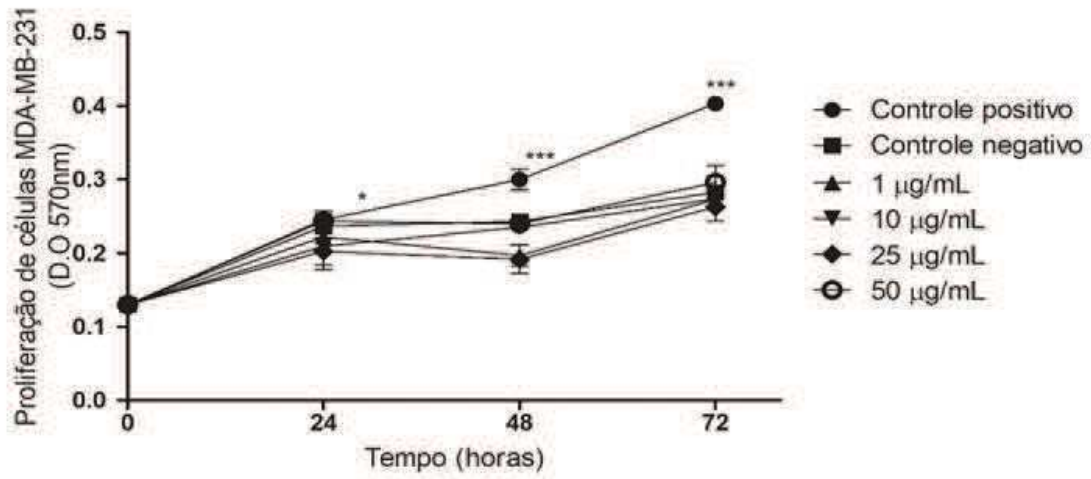
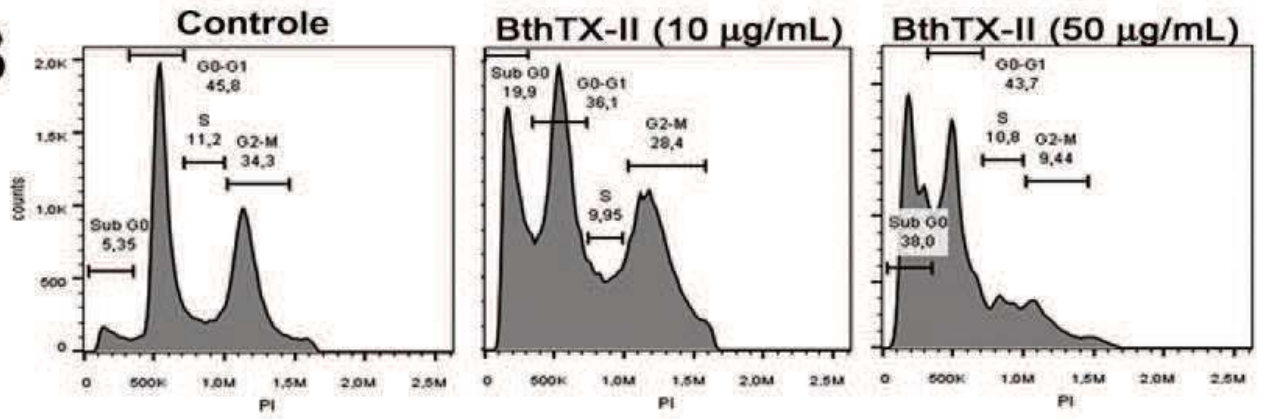
**FIGURA 4: AÇÃO CITOTÓXICA E MORTE CELULAR INDUZIDA PELA BthTX-II SOBRE CÉLULAS MDA-MB-231** (A) Citotoxicidade por ensaio MTT. Células MDA-MB-231 E MCF10A tratadas com BthTX-II (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 E 1,56  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) e controle de células não tratadas. (B) Vacúolos autofágicos em células MDA-MB-231 E MCF10A corados com MDC após exposição a BthTX-II (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) por 24 H. Os autofagossomos (azul) detectados em células MDA-MB-231 após tratamento e a porcentagem de células que apresentam vacúolos autofágicos foram analisadas pelo software ImageJ e posteriormente comparados com respectivos controles de células não tratadas. As barras brancas representam 200 $\mu\text{m}$  como escala de referência. (C) Análise de Apoptose por citometria De fluxo. Células MDA-MB-231 tratadas com BthTX-II (10 E 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ou controle células não tratadas por 24 h e incubadas com Anexina V / FITC e iodeto de propídio. As aquisições representativas de pontos mostram a distribuição das células MDA-MB-231 apresentando necrose (quadrante superior esquerdo), apoptose precoce (quadrante inferior direito) e apoptose tardia (quadrante superior direito). (D) Expressão dos genes da via de apoptose por PCR em tempo real comparado ao controle; os genes (*BAD*, *BAX*, *BCL2*, *BCL2L1*, *BIRC5*, *TNFRSF10B* não apresentaram diferença na expressão, enquanto o *TNF*, *TNFRSF1A* E *CASP8* foram suprarregulados e a *ANGPT1* foi regulada negativamente em comparação ao controle de células não tratadas. (E) Efeitos da BthTX-II (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) nos níveis de lactato desidrogenase (LDH) em células MDA-MB-231 após 24 h em comparação com controle não tratado. Os valores representam a média  $\pm$  S.D. (n=3) de três experimentos

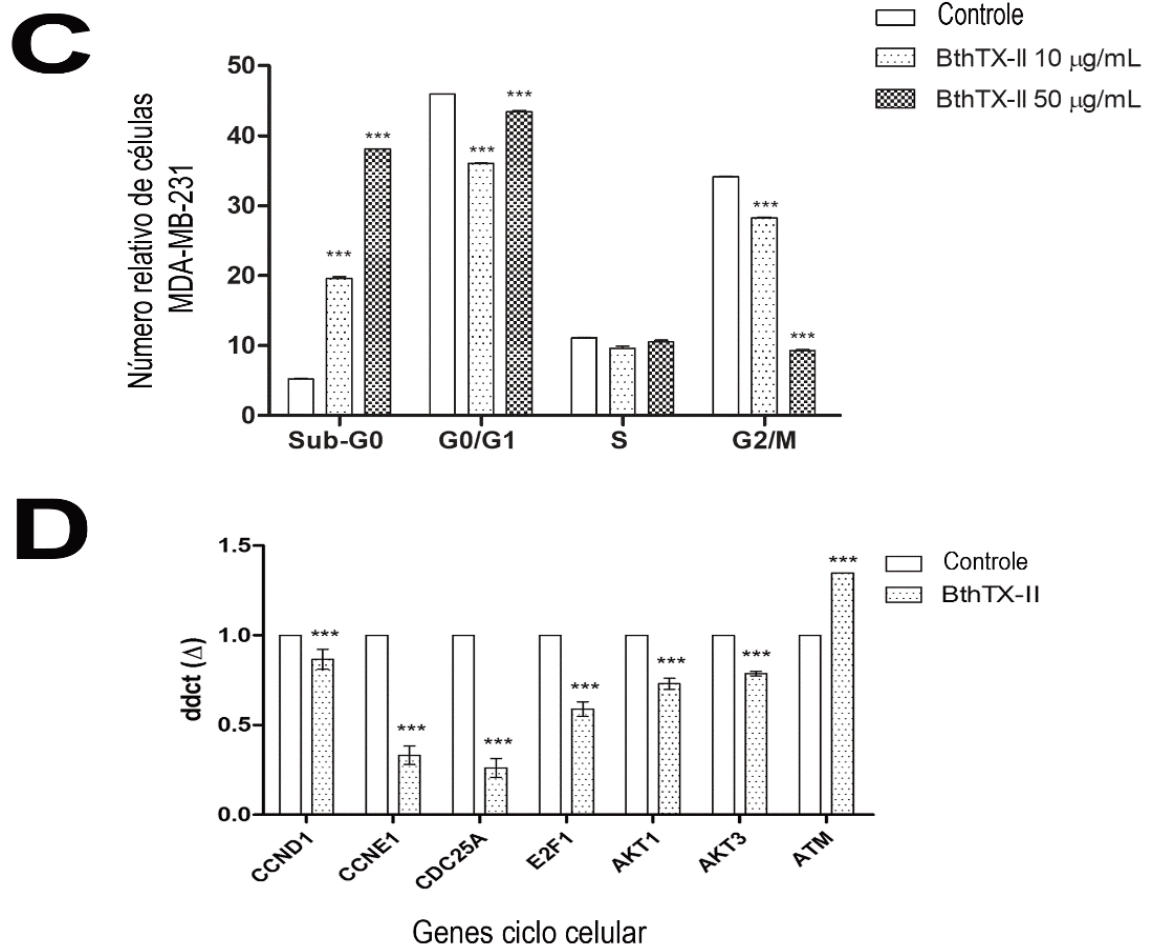
independentes. As diferenças entre os tratamentos e os controles foram analisados por One-Way Anova e teste-t não pareado estatisticamente significativo, \*\*\*Diferença estatisticamente significativa (P <0,001)

## **8.2. BthTX-II inibe a proliferação celular e promove a parada do ciclo celular na fase G2/M**

O efeito da BthTX-II (1, 10, 25 e 50 µg/mL) sobre a proliferação de células MDA-MB-231 está demonstrado na Figura 5A. Como pode ser observado, todas as concentrações inibiram significativamente a proliferação celular após 72 horas de tratamento, inclusive nas menores concentrações, quando comparado com o controle positivo (células + SFB). Além disso, progressão do ciclo celular nestas células após tratamento com BthTX-II (10 e 50 µg/mL) foi comprometida, resultando na parada de aproximadamente 19,9% e 38% das células na fase Sub-G0, quando comparadas às células controle (5,35%), respectivamente (Figura 5B e 5C). Em contrapartida, BthTX-II promoveu uma diminuição significativa da fase G1 e aumento da fase G2 /M, 24 h após o tratamento (Figura 5B e 5C). A porcentagem de células na fase S permaneceu praticamente na mesma quantidade com 9,95% e 10,8% após tratamento com BthTX-II (10 e 50 µg/ml, respectivamente), quando comparados ao seu controle (11,2%).

A expressão de genes envolvidos no ciclo celular também foi avaliada após o tratamento de células TNBC com BthTX-II (Figura 5D). BthTX-II induziu uma regulação negativa dos genes *CCND1*, *CCNE1*, *CDC25A*, *E2F1*, *AKT1* e *AKT3*. Em contraste, o gene *ATM*, supressor de tumor e responsável pelo início da parada do ciclo celular e reparo de DNA foi regulado positivamente (1,34 vezes) (Figura 5D).

**A****B**



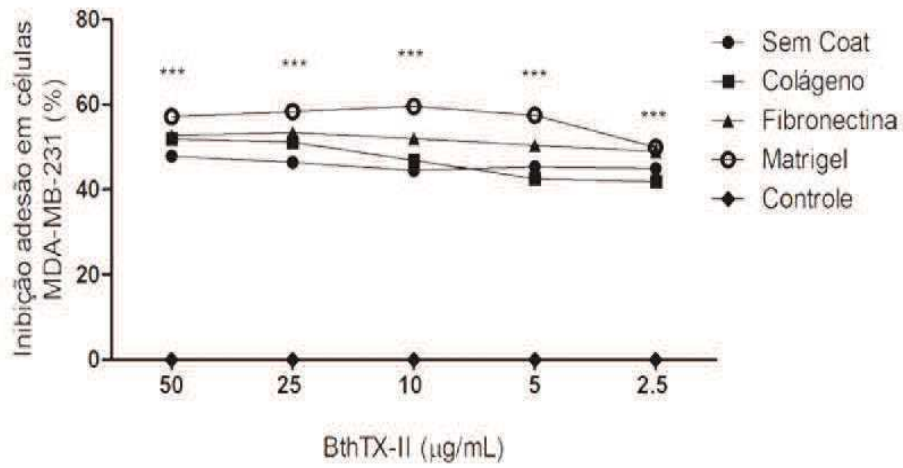
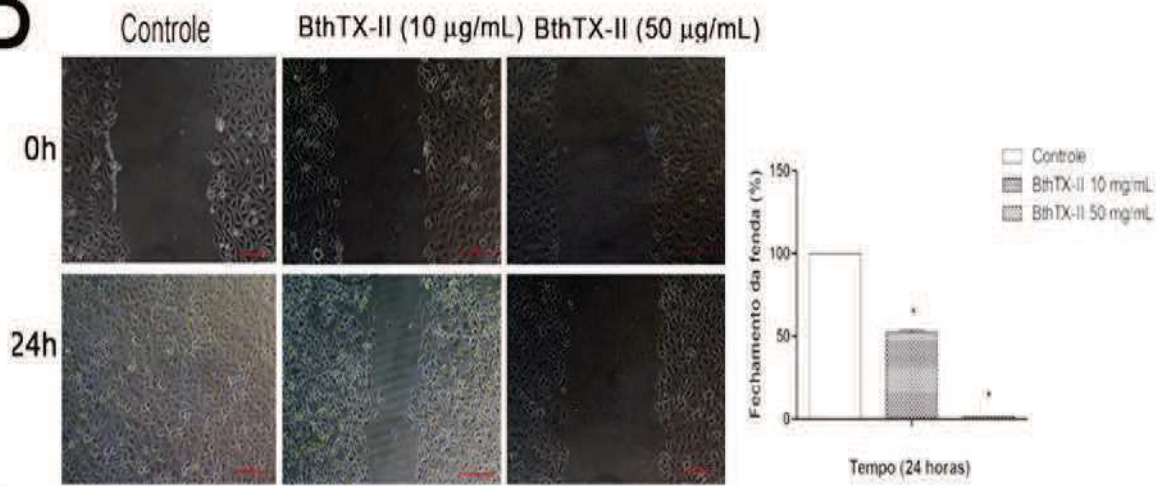
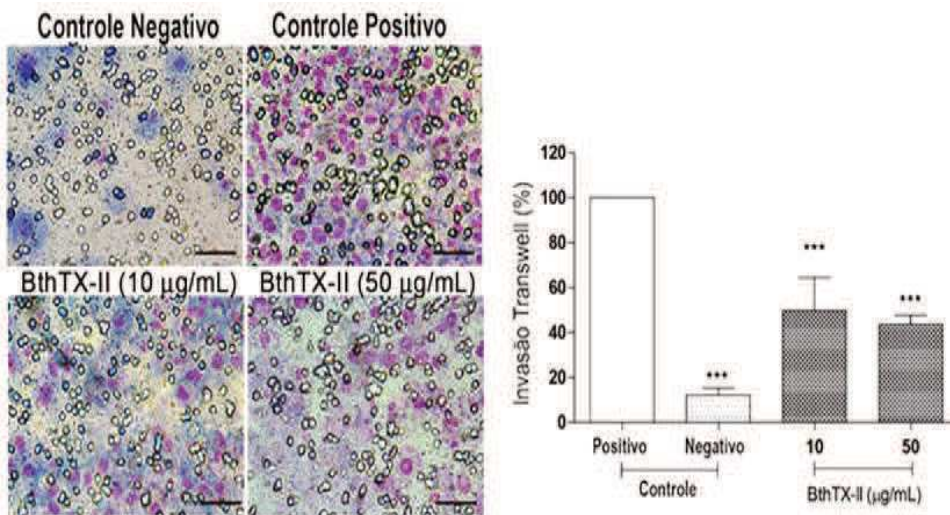
**FIGURA 5: EFEITO DA BthTX-II NA PROLIFERAÇÃO CELULAR E PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS MDA-MB-231** (A) Inibição da proliferação de MDA-MB-231 durante 24, 48 E 72 h em comparação com controle MDA-MB-231 estimuladas ou não com SFB. (B) Análise do ciclo celular pela técnica de iodeto de propídeo, resultado apresentado em comparação com célula sem tratamento. (C) Representação da porcentagem de células nas várias populações do ciclo celular após o tratamento com BthTX-II em comparação com célula não tratada. (D) Avaliação da expressão de Genes (qPCR) importantes na sinalização de moléculas envolvidas no ciclo celular e no reparo do DNA após tratamento com BthTX-II. Os genes (*CCND1*, *CCNE1*, *CDC25A*, *E2F1*, *AKT1*, *AKT3*) foram reprimidos enquanto o gene *ATM* foi regulado positivamente. Os valores representam a média  $\pm$  dp de três experimentos independentes, analisados por two-way anova e pós-teste de Tukey \*\*\*diferença estatística foi significativa ( $p < 0,001$ ) quando comparado com os respectivos controles (célula não tratada com BthTX-II).

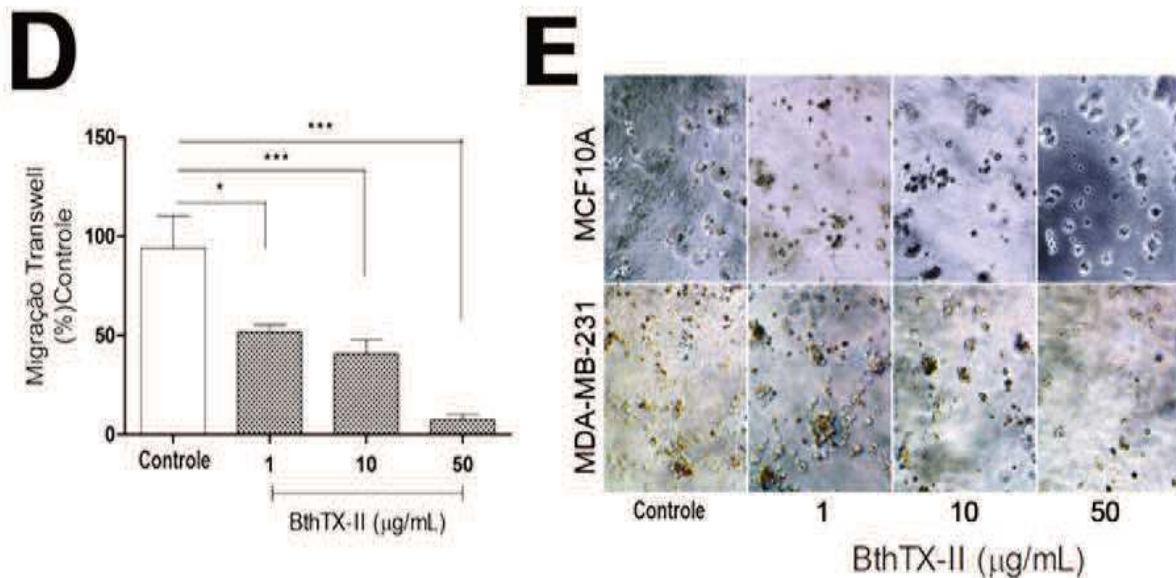
## 9. Efeito antimetastático da BthTX-II

### 9.1. BthTX-II interfere na adesão, migração, invasão e no crescimento de esferóides celulares (3D) de células MDA-MB-231

BthTX-II em diferentes concentrações (2,5 a 50  $\mu\text{g/mL}$ ) foi capaz de inibir aproximadamente 45% a 60% a adesão de células MDA-MB-231 sobre diferentes substratos. Na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ , a proteína induziu uma inibição de 57%, 52% e 53% na adesão das células sobre o matrigel, fibronectina e colágeno, respectivamente, quando comparados com o controle não tratado (Figura 6A). Além disso, a BthTX-II (10 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) também foi capaz de inibir significativamente a migração celular pelo ensaio de *wound healing* em comparação com o controle (meio) por 24 horas (Figura 6B). Esses resultados corroboraram com o efeito da PLA<sub>2</sub> no ensaio de migração por *transwell*, que demonstrou a capacidade de BthTX-II (10 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) em reduzir a migração de células MDA-MB-231 em aproximadamente 57% e 50%, respectivamente em relação ao controle positivo (Figura 6C).

Além disso, BthTX-II nas concentrações de 1, 10 e 50  $\mu\text{g/mL}$  inibiu 49%, 60% e 92%, respectivamente a habilidade de invasão das células MDA-MB-231 pelo ensaio *Matrigel-transwell* (Figura 6D). Interessantemente, BthTX-II (1, 10 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) demonstrou atividade sobre estruturas esféricas (3D) de células de câncer de mama triplo negativo por inibir o crescimento em 3D e a formação de estruturas esféricas (tumores-mamosferas) quando comparado com as células MCF10A não tumorigênicas (Figura 6E).

**A****B****C**

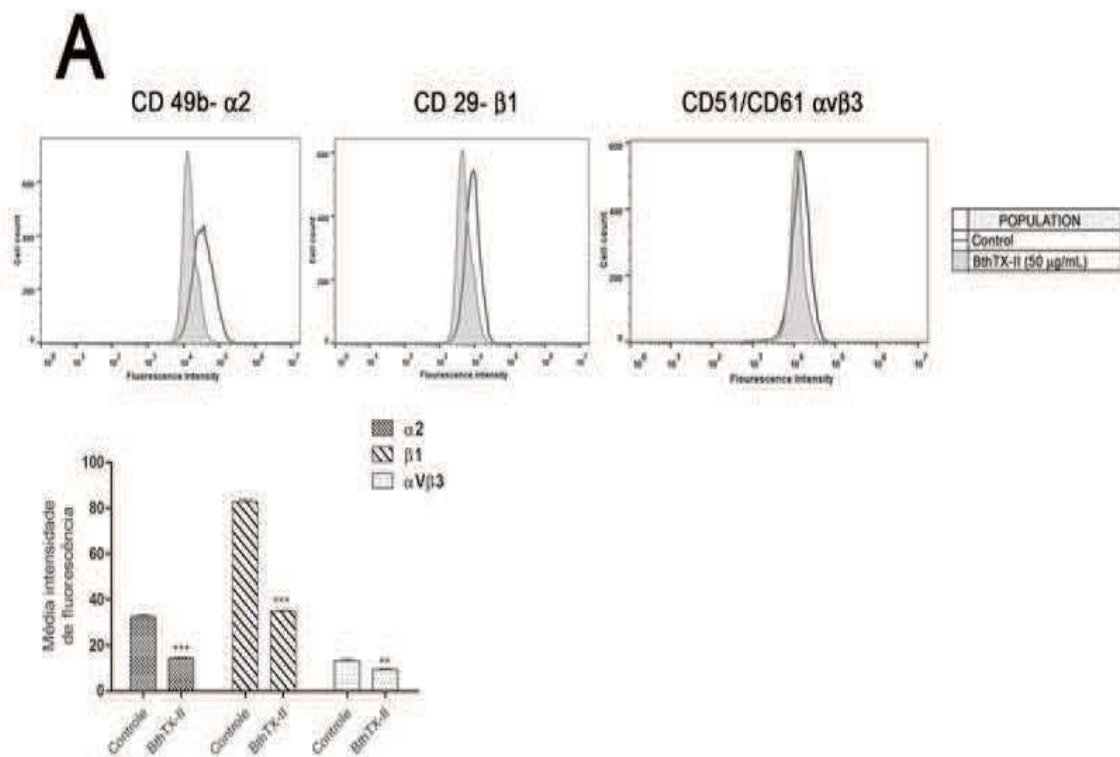


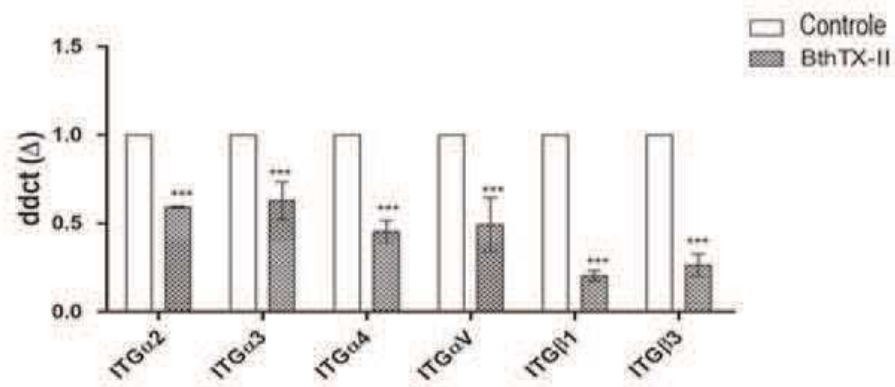
**FIGURA 6: EFEITO DA BthTX-II NA ADESÃO CELULAR, MIGRAÇÃO, INVASÃO E CRESCIMENTO 3D DE CÉLULAS MDA-MB-231 (A)** Células MDA-MB-231 ( $3 \times 10^4$  células/poço) foram pré-incubadas com BthTX-II (50, 25, 10, 5, 2,5 µg/ml) por 30 min. Após tratamento as células foram semeadas sobre poços revestidos com colágeno, fibronectina, matrigel e sem revestimento. As células aderidas foram mensuradas por MTT e comparadas com controle de célula sem tratamento. **(B)** Células MDA-MB-231 ( $4 \times 10^6$ /poço) foram cultivadas até à confluência. No tempo ( $t = 0$ ) foi feita uma fenda e o poço foi fotografado. Após 24 horas do tratamento com a BthTX-II (10 e 50 µg/ml), a área não preenchida foi fotografada e quantificada utilizando o software ImageJ e análises feitas em comparação com célula não tratada. **(C)** Células MDA-MB-231 ( $1 \times 10^5$  célula/transwell) foram submetidas ao ensaio de inibição da migração por *transwell*. As imagens representativas das células migradas (coradas com hematoxilina-panótico) foram contadas sob um microscópio óptico mostrando quase 100% de inibição da migração em coparação com controle positivo, células estimuladas SFB. **(D)** Células MDA-MB-231 ( $2,5 \times 10^5$ /poço) foram tratadas com a BthTX-II (1, 10 e 50 µg/ml) e posteriormente submetidas ao ensaio de invasão em matrigel/transwell e analisadas em comparação controle célula sem tratamento. **(E)** Ensaio tridimensional em matrigel mostrando inibição da formação de células MDA-MB-231 esferoidais por BthTX-II (1, 10 e 50 µg/ml) quando comparadas com células não tratadas e com as células MCF10A não tumorigênicas nas mesmas situações. Os valores representam média  $\pm$  S.D. em cinco campos diferentes das membranas e o experimento foi feito em triplicata e analisados pelo One-Way Anova, \*\*\*  $p < 0,001$  em comparação com os respectivos controles.



## 9.2. BthTX-II modula a expressão de integrinas envolvidas com o processo de angiogênese tumoral

O tratamento das células MDA-MB-231 com BthTX-II diminuiu a expressão proteica de três importantes integrinas -  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  (Figura 13A), bem como a expressão de seus respectivos genes (*ITGa2*, *ITGa3*, *ITGa4*, *ITGaV*, *ITG $\beta$ 1* e *ITG $\beta$ 3*) na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 7B). Estes resultados corroboram com os anteriores (Figura 6), onde nessa mesma concentração a PLA<sub>2</sub> foi capaz de inibir significativamente a expressão de diferentes genes e proteínas importantes para a sobrevivência das células, adesão celular, progressão do tumor e metástase.



**B**

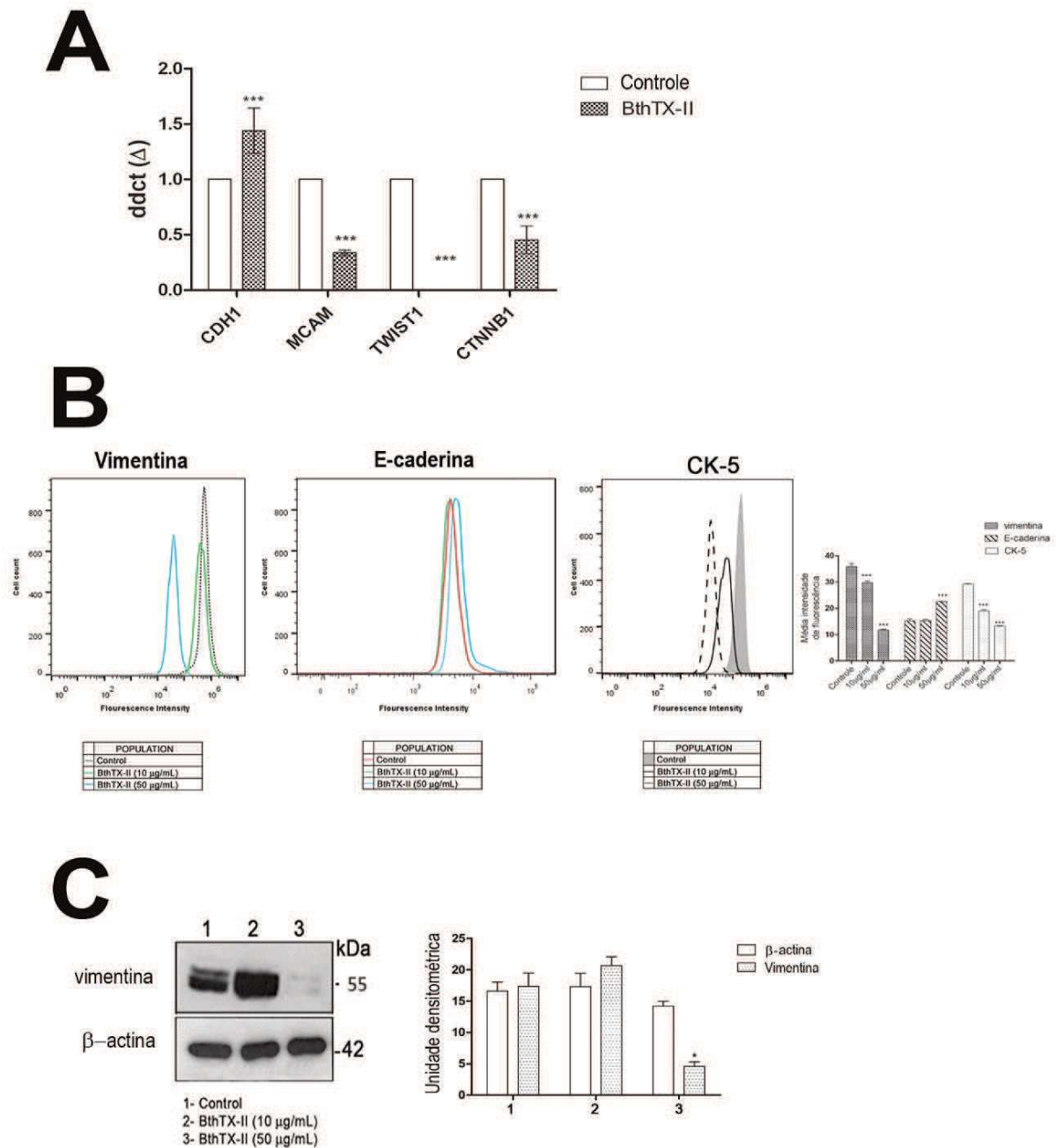
**Figura 7: EFEITO DA BthTX-II SOBRE A EXPRESSÃO DE INTEGRINAS.** (A) Representação gráfica dos valores medianos da expressão de integrinas na membrana plasmática de células MDA-MB-231. A BthTX-II Promoveu uma redução na intensidade de fluorescência mediana das integrinas  $\alpha 2$   $\alpha V\beta 3$  E  $\beta 1$ . (B) O tratamento com BthTX-II promoveu uma sub-regulação de *ITGa2*, *ITGa3*, *ITGa4*, *ITGβ2*, *ITGaV* e *ITGβ1* em comparação com o grupo controle (células não tratadas). Os valores representam a média  $\pm$  S.D (N=3) de três experimentos independentes, analisados por Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni \*\*\* Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao controle de células MDA-MB-231 não tratadas com BthTX-II.

### 9.3. BthTX-II modula a expressão de marcadores epiteliais e mesenquimais em células MDA-MB-231.

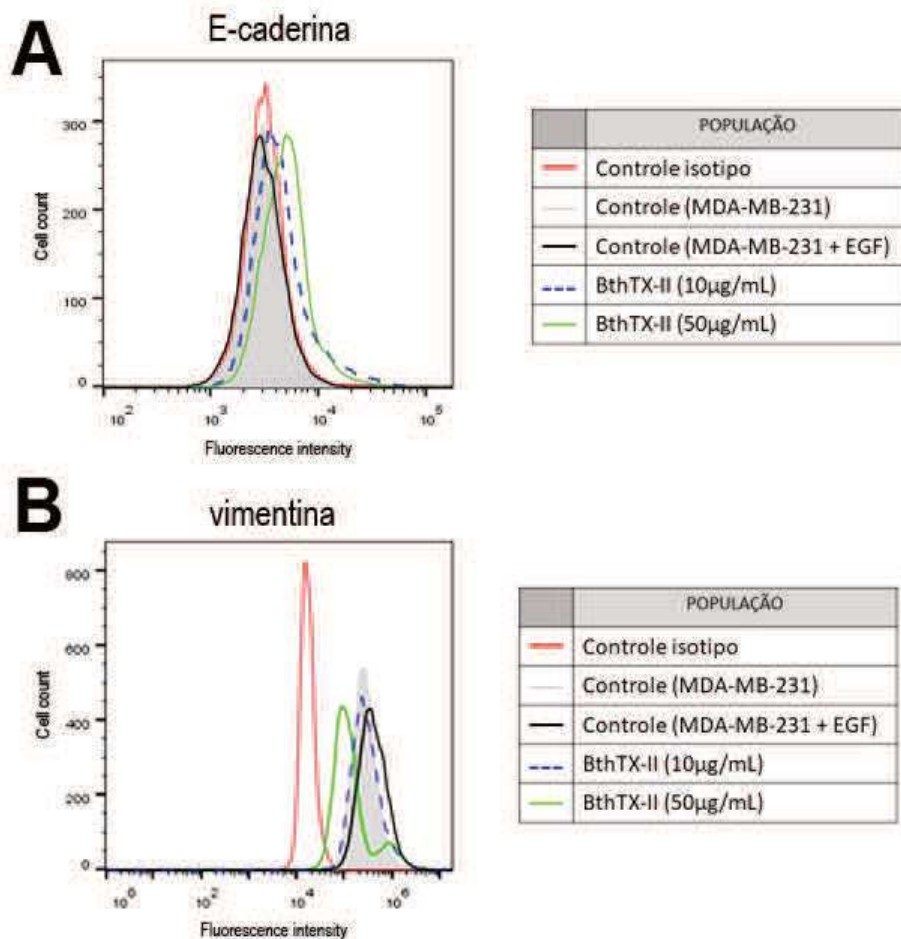
A expressão de alguns genes e proteínas envolvidos no processo de invasão, metástase e transição epitelio-mesenquima (EMT) foi avaliada após o tratamento das células MDA-MB-231 com a BthTX-II (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Figura 8). A proteína foi capaz de reduzir a expressão dos genes *MCAM*, *CTNNB1* e *CTNNB1* em 0,33, 2,22 e 0,000000104 vezes, respectivamente (Figura 8A). Estes genes codificam importantes proteínas que regulam e coordenam a adesão célula-célula, a transcrição gênica e metástase. Por outro lado, a expressão do gene *CDH1* que codifica E-caderina foi regulada positivamente em 1,43 vezes após o tratamento com BthTX-II (Figura 8A). A análise da expressão proteica

avaliada por *western blotting* revela que a BthTX-II (10 e 50 µg/mL) induziu um aumento da E-caderina (Figura 8B) e diminuiu significativamente a expressão de citoqueratina (CK-5) e vimentina em células MDA-MB-231 (Figura 8B e 8C), respectivamente.

Adicionalmente, as células MDA-MB-231 foram estimuladas com fator de crescimento epidérmico (EGF), para indução de EMT, sendo esse fator chave nas malignidades epiteliais e no aumento do crescimento tumoral com elevada expressão de vimentina e ausência de E-caderina (Controle) (Figura 9A e 9B). Posteriormente ao estímulo com EGF, as células foram tratadas com a BthTX-II (10 e 50 µg/mL) e foram capazes de diminuir a expressão proteica de vimentina e estimular a expressão de E-caderina (Figura 9A e 9B respectivamente).



**FIGURA 8: EFEITO DA BthTX-II NA EXPRESSÃO DOS MARCADORES EMT DE CÉLULAS MDA-MB-231 (A)** O Tratamento com a BthTX-II promoveu uma regulação positiva do gene *CDH-1* e modulação negativa dos genes *MCAM*, *CTNNB1* e *TWIST1*, comparado ao grupo controle, células sem tratamento (MDA-MB-231). **(B)** Análise por citometria de fluxo de vimentina, E-caderina e CK-5 após tratamento com BthTX-II (10 e 50 μg/ml). **(C)** Análise por *western blot* de vimentina e actina após tratamento BthTX-II (10 e 50 μg/ml). As bandas foram quantificadas pelo software IMAGEJ e representadas no histograma ao lado. Os valores representam média ± S.D (n = 3). As diferenças entre tratamentos e controles foram analisadas pelo Teste-t não pareado. Estatisticamente significativo: \*\* p < 0,001.



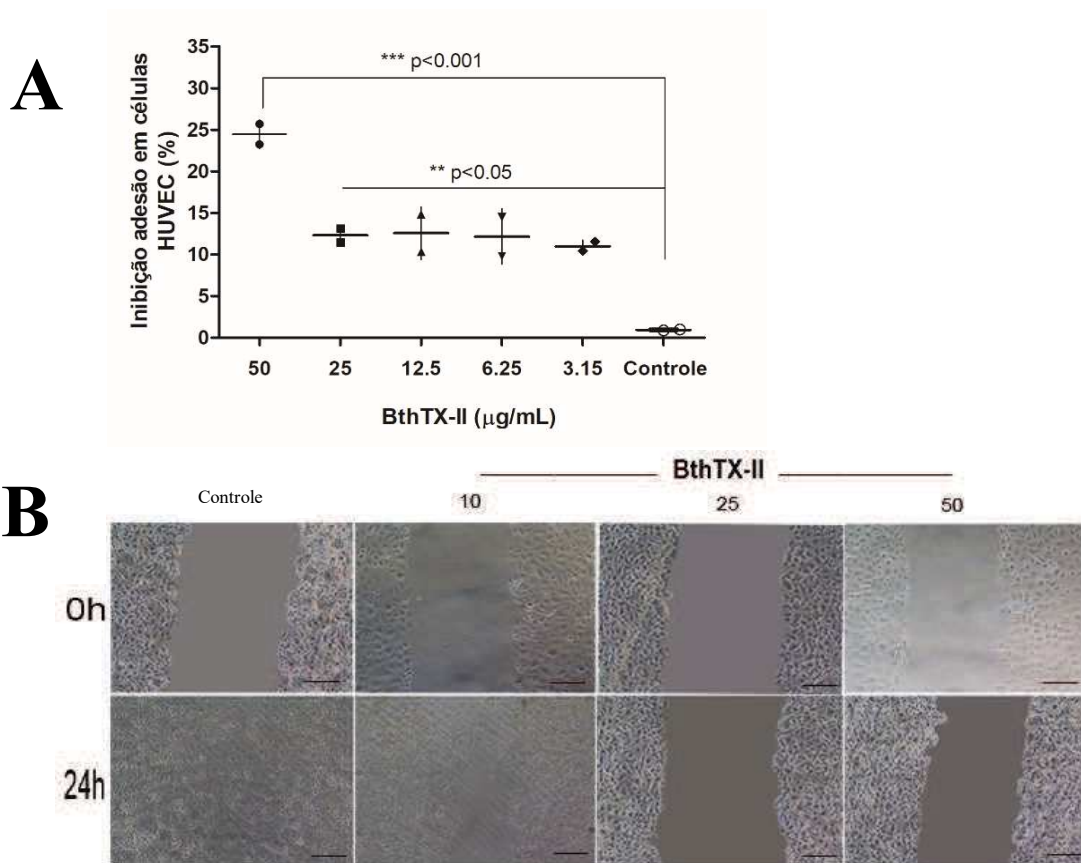
**FIGURA 9: ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DE VIMENTINA E E-CADERINA APÓS TRATAMENTO BHTX-II (10 E 50 µg/mL) SOBRE CÉLULAS MDA-MB-231 ESTIMULADAS COM EGF. (A)** O tratamento com BthTX-II foi capaz de induzir a expressão da proteína E-caderina nas células MDA-MB-231 com e sem estímulo com EGF em ambas concentrações. **(B)** O tratamento com BthTX-II foi capaz de reduzir a expressão da proteína vimentina nas células MDA-MB-231 com e sem estímulo com EGF. Os valores representam média ± S.D (n=3) de três experimentos independentes analisados por Two-way anova.

## **10. Efeito antiangiogênico da BthTX-II**

### **10.1. BThTX-II interfere na adesão e migração de células HUVEC**

O efeito antiangiogênico da BthTX-II foi inicialmente verificado sobre a inibição da atividade de adesão e migração de células endoteliais humana (HUVEC) (Figura 10). Diferentes concentrações de BthTX-II (3,15 a 50 µg/mL) inibiram a adesão das células HUVECs (figura 10A), sendo que na maior concentração (50 µg/mL), a PLA<sub>2</sub> inibiu a adesão em aproximadamente 25% e nas demais concentrações foi capaz de inibir entre 10 a 15% a capacidade de adesão celular.

O ensaio de migração por “*wound healing*” demonstrou que a BthTX-II também interferiu na migração das células HUVECs após o tratamento com 10, 25 e 50 µg (Figura 10B) (\*\*p < 0,001).



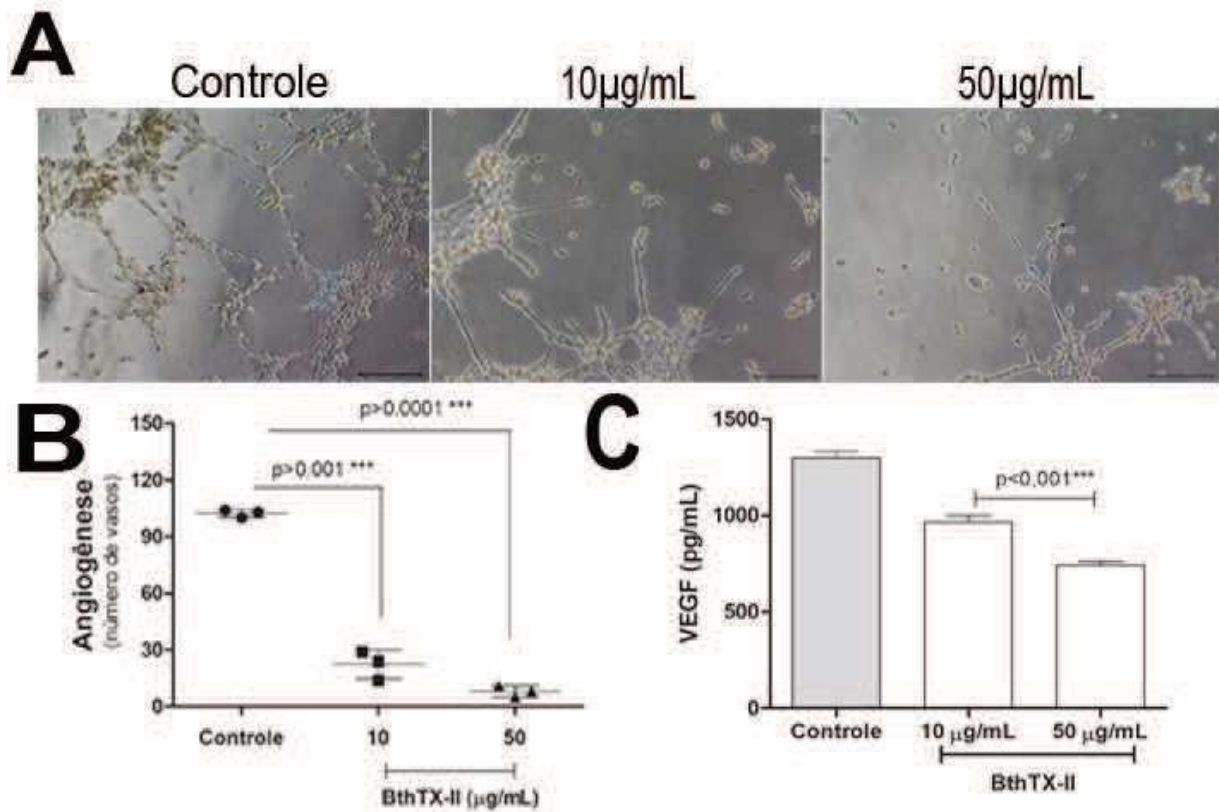
**FIGURA 10: INIBIÇÃO ADESÃO E MIGRAÇÃO (A)** Interferência da BthTX-II na adesão de células HUVECs pré-incubadas com BthTX-II (50, 25, 12.5, 6.25, 3.15 µg/ml) por 30 min. **(B)** Ensaio de cicatrização de ferida *wound healing*. A monocamada celular foi cultivada até à confluência e no tempo experimental  $t = 0$  foi feita uma fenda. Cada poço foi fotografado no tempo  $t = 0$  e  $t = 24$  horas após o tratamento com BthTX-II (10, 25 e 50 µg/ml). Os valores representam a MÉDIA  $\pm$  S.D (n=3) de três experimentos independentes, analisados por Two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni \*\*\* diferença estatística ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao controle de células sem tratamento.

## **10.2. BthTX-II inibe a formação de vasos e diminui a produção do fator de crescimento endotelial (VEGF) (modelo *in vitro*)**

O tratamento com a BthTX-II reduziu significativamente a formação de vasos induzidos por bFGF (fator básico de crescimento fibroblasto) em Matrigel™. No ensaio *in vitro* foram quantificados uma média de 105 vasos no grupo controle, 20 vasos no grupo tratado com a BthTX-II (10 µg/ml) e 6 vasos após o tratamento com 50 µg/ml. Resultado esse que demonstra uma redução de 80% ou mais para ambos os tratamentos (\*\*p<0,001) (Figura 11A e 11B).

Nesse ensaio também foi quantificado os níveis de VEGF (fator de crescimento endotelial) no sobrenadante de células HUVECs após o tratamento com BthTX-II (10 e 50 µg/ml) em comparação com controle de células tratadas com PBS (controle negativo). A PLA<sub>2</sub> reduziu para 960 e 740pg/ml, respectivamente os níveis de VEGF, quando comparado com o controle (1250 pg/ml) (figura 11C \*\*\*p<0,001).

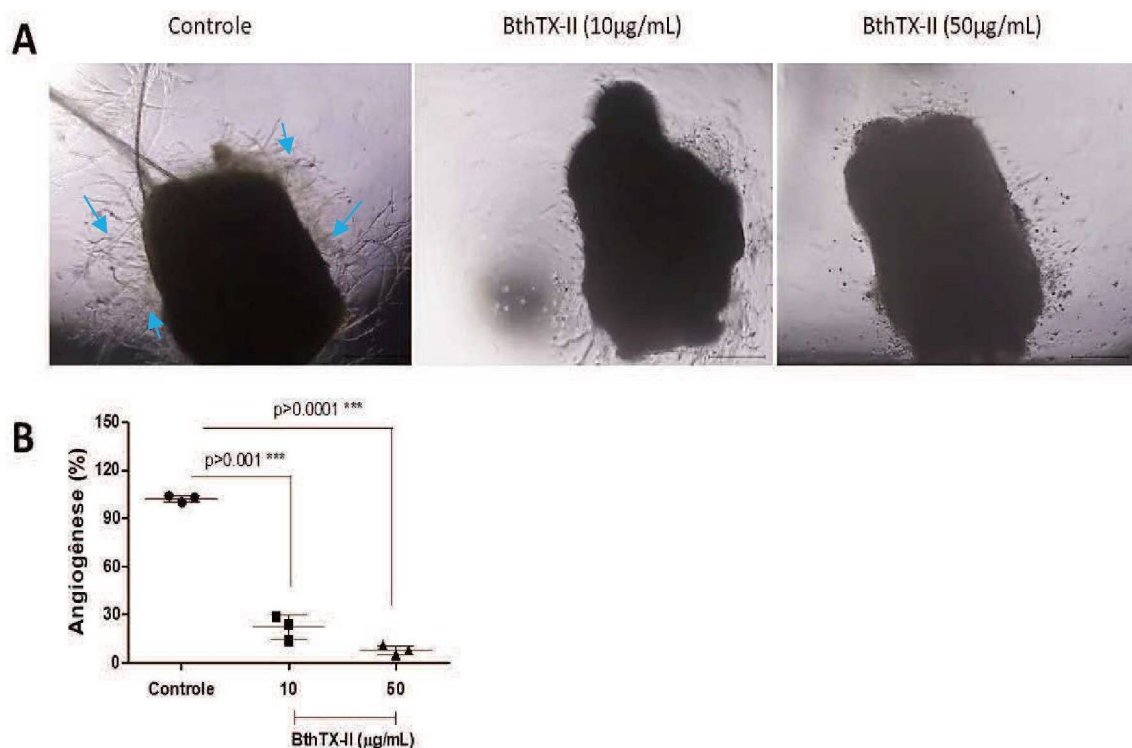




**FIGURA 11: INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE VASOS *IN VITRO* PELA BthTX-II EM CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS (HUVEC).** A) Imagem representativa da inibição da formação da rede de vasos de células HUVECS induzidas com bFGF em Matrigel após pré-tratamento com a BthTX-II (10 e 50 µg/ml). B) Representação gráfica da quantificação do número de vasos formados pelas células HUVEC após 18 horas. C) Quantificação do nível de VEGF liberado no sobrenadante das células após a formação de vasos. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e os valores representam média ± S.D (n=3); diferenças comparada entre os tratamentos e o controle de vasos formados e VEGF liberados, foram analisados pelo One-way anova. Valores estatisticamente significativos foram representados por \*\*p<0,05 e \*\*\*p<0,001. Barra de escala, 200 µm.

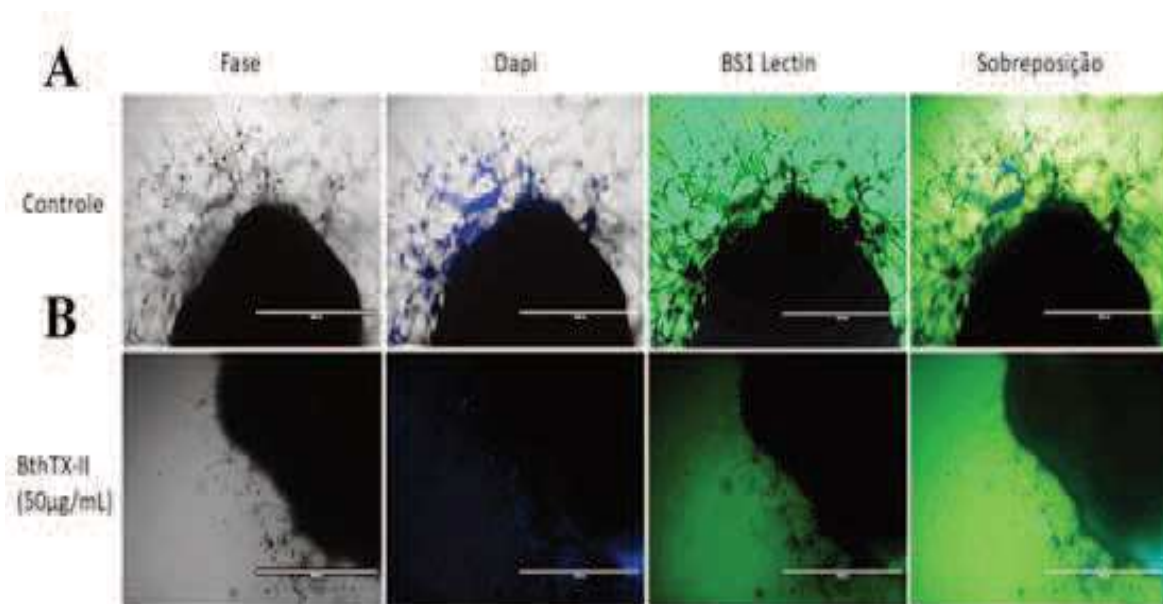
### 10.3. BthTX-II inibe a formação de vasos através do anel de aorta de camundongos (modelo *ex vivo*)

O efeito antiangiogênico *ex vivo* em cultura com Matrigel™ induzido pela BthTX-II foi confirmado pela redução da quantidade de microvasos celulares formados a partir dos fragmentos de vasos aórticos dos grupos tratados com BthTX-II (10 e 50 µg/ml) e comparados com o controle sem tratamento (Figura 12A). A Figura 12B representa os valores numéricos de microvasos formados pelos brotamentos de anel aórtico formados no controle em comparação com os tratamentos com BthTX-II (10 e 50 µg/ml), e a diferença entre os tratamentos foram analisados e representados no gráfico % angiogênese.



**FIGURA 12: INIBIÇÃO DA ANGIOGÊNESE PELO MODELO *EX VIVO* (AORTIC RING ASSAY).** (A) Imagens representativas de microvasos celulares (indicado pelas setas) a partir de fragmento de aorta retirado de camundongos em modelo *ex vivo* após 7 dias de tratamento com BthTX-II. (B) Representação gráfica da quantificação do número de microvasos formados pelos brotamentos de anel aórtico formados no controle em comparação com os tratamentos. Diferenças comparada entre os tratamentos e controle foram analisados pelo One-way anova. Valores estatisticamente significativos foram representados por \*\* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ . Barra de escala, 200 µm.

Os fragmentos de aorta retirados de camundongos em modelo *ex vivo* após 7 dias de tratamento com BthTX-II foram fixados e corados por imunofluorescência, com objetivo de examinar a estrutura e brotamento dos microvasos celulares. Na figura 13A visualiza-se o controle com presença de brotamentos de microvasos celulares que estão marcados com BS1-Lectin, corante endotelial específico em verde, e em azul, exhibe marcação nuclear revelada com o corante (DAPI), nas junções entre os vasos formados. Em contrapartida quando comparados o crescimento endotelial após tratamento com BthTX-II (50 µg/mL), não há presença de marcação para os microvasos em verde e pouca marcação nuclear em azul (figura 13B), demonstrando a eficácia do tratamento na angiogênese *ex-vivo*.



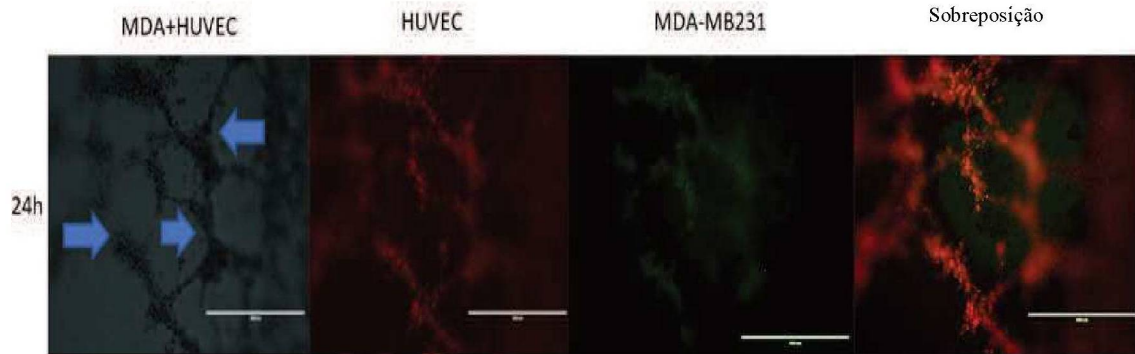
**FIGURA 13: COLORAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA DA ANGIOGÊNESE INDUZIDA NO MODELO DO ANEL AÓRTICO.** Imagens de marcação fluorescente de microvasos induzidos por fator de crescimento em matrigel. **(A)** controle exibe presença de microvasos marcados com BS1-LECTINA-FITC (verde) e marcação nuclear em azul, corados com DAPI. manchas em brotos endoteliais bem formados (controle) **(B)** após tratamento com BthTX-II (50 µg/ml), ausência de marcação e formação de microvasos em verde, com poucos brotos com marcação nuclear com DAPI (azul). barra de escala, 200 µM.

#### **10.4. BthTX-II inibe a angiogênese tumoral pelo ensaio de co-cultura de células MDA-MB-231 e HUVEC**

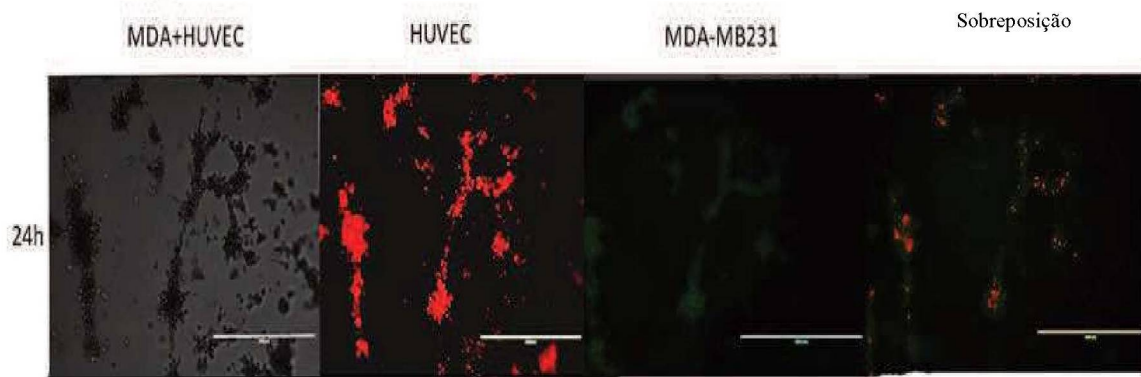
A fim de avaliar a interação das células endoteliais com as células epiteliais mamárias cancerígenas foi realizado o ensaio de co-cultura celular em 3D. Os esferóides de mama pré-formados foram adicionados as redes de vasos endoteliais pré-formados em matrigel. A figura 14A apresenta os grupos controle (MDA-MB-231 + HUVEC) onde se observa o encontro entre os esferóides de mama, representado pelas setas azuis, em contato com os vasos endoteliais. Nas imagens posteriores, as células HUVEC estão marcadas em vermelho, tornando possível ver toda a extensão dos vasos em 24h. As células MDA-MB-231 estão marcadas em verde podendo identificar com 24h maior aglomerado de células TNBC. Também é importante salientar que o co-cultivo de células HUVECs e MDA-MB-231 foi capaz de induzir alterações na morfologia das mesmas devido a interação entre elas.

As figuras (14B e 14C) representam os tratamentos com (BthTX-II 10 e 50 $\mu$ g/mL) respectivamente por um período de 24h. O tratamento com 10 $\mu$ g/mL exibe efeito de inibição na agregação celular, principalmente nas células endoteliais. Em adição, o tratamento com 50 $\mu$ g/mL, exibe efeito na inibição total da migração e proliferação da co-cultura de células pelo período de 24h, comparados com o controle celular em matrigel.

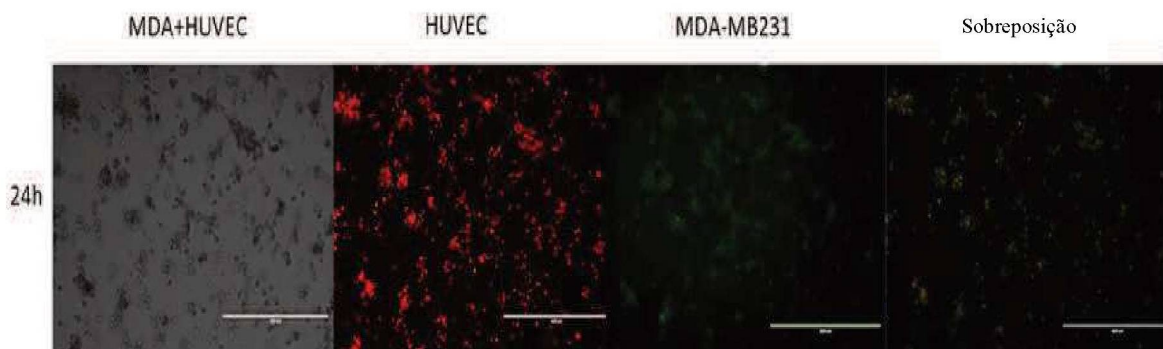
Controle



BthTX-II 10 $\mu$ g/mL



BthTX-II 50 $\mu$ g/mL



**FIGURA 14: ANGIOGÊNESE TUMORAL, CO-CULTURA HUVEC/MDA-MB-231: A)** controle células MDA-MB-231 e HUVEC, em co-cultura, representando modelo angiogênese tumoral. Setas representam o encontro dos esferoides de células TNBC com vasos endoteliais recém-formados. **B)** Tratamento com BthTX-II 10 $\mu$ g/mL em co-cultura de células, com inibição da migração e proliferação celular. **C)** Tratamento com BthTX-II 50 $\mu$ g/mL, com efeito total na inibição migração e proliferação de células, após 24h de tratamento e em ambas as concentrações.

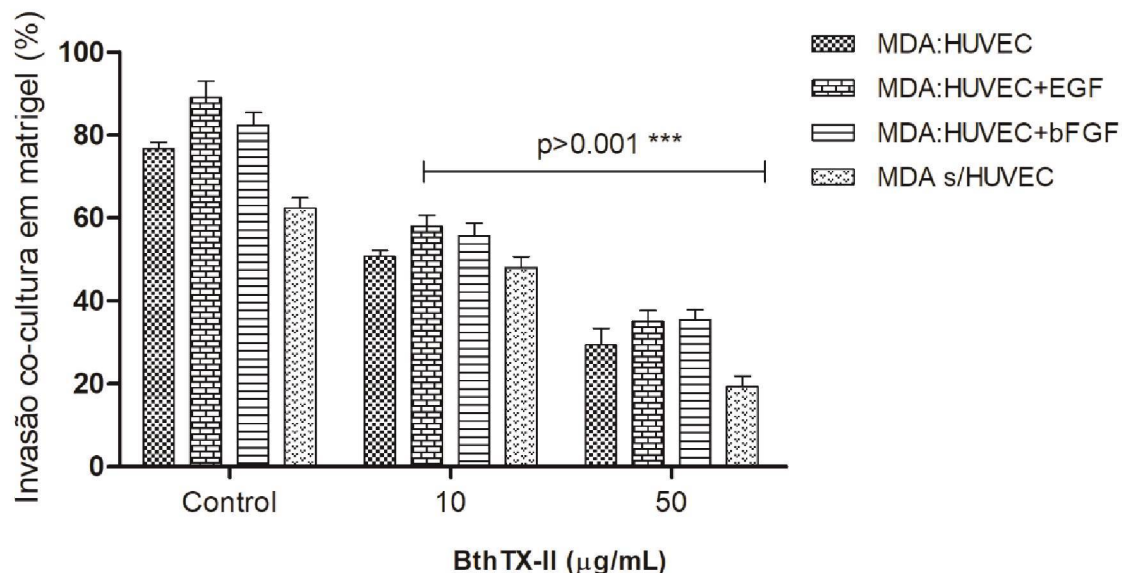
#### **10.5. BThTX-II inibe a invasão em co-cultura de células MDA-MB-231: HUVEC.**

Células MDA-MB-231 co-cultivada com células endoteliais humana (HUVECs) em ensaio transwell/matrigel foram submetidas sob a ação de diversos estímulos (EGF e bFGF) e tratadas com BthTX-II.

Células MDA-MB-231 apresentaram uma capacidade invasiva em matrigel de 73% e 63% quando cultivadas na presença ou ausência de células HUVEC, respectivamente. As células MDA-MB-231 também foram estimuladas com EGF e bFGF e apresentaram capacidade de invadir em 89% e 82,3%, após os estímulos descritos, respectivamente (Figura 15).

A BthTX-II (10 µg/mL) inibiu a invasão das células MDA-MB-231 em 50% em sistema de co-cultura com células HUVEC. Na presença de fatores de crescimento, a toxina inibiu em 42% a invasão exercida pelo EGF e 45% pelo bFGF, quando em sistema de cocultura (MDA-MB-231+HUVEC).

Adicionalmente, quando as células MDA-MB-231, na ausência ou presença de fatores de crescimento, bem como em sistema de cocultura foram tratadas com BthTX-II (50µg/mL) apresentaram uma inibição de 70% a 80% na invasão em matrigel.



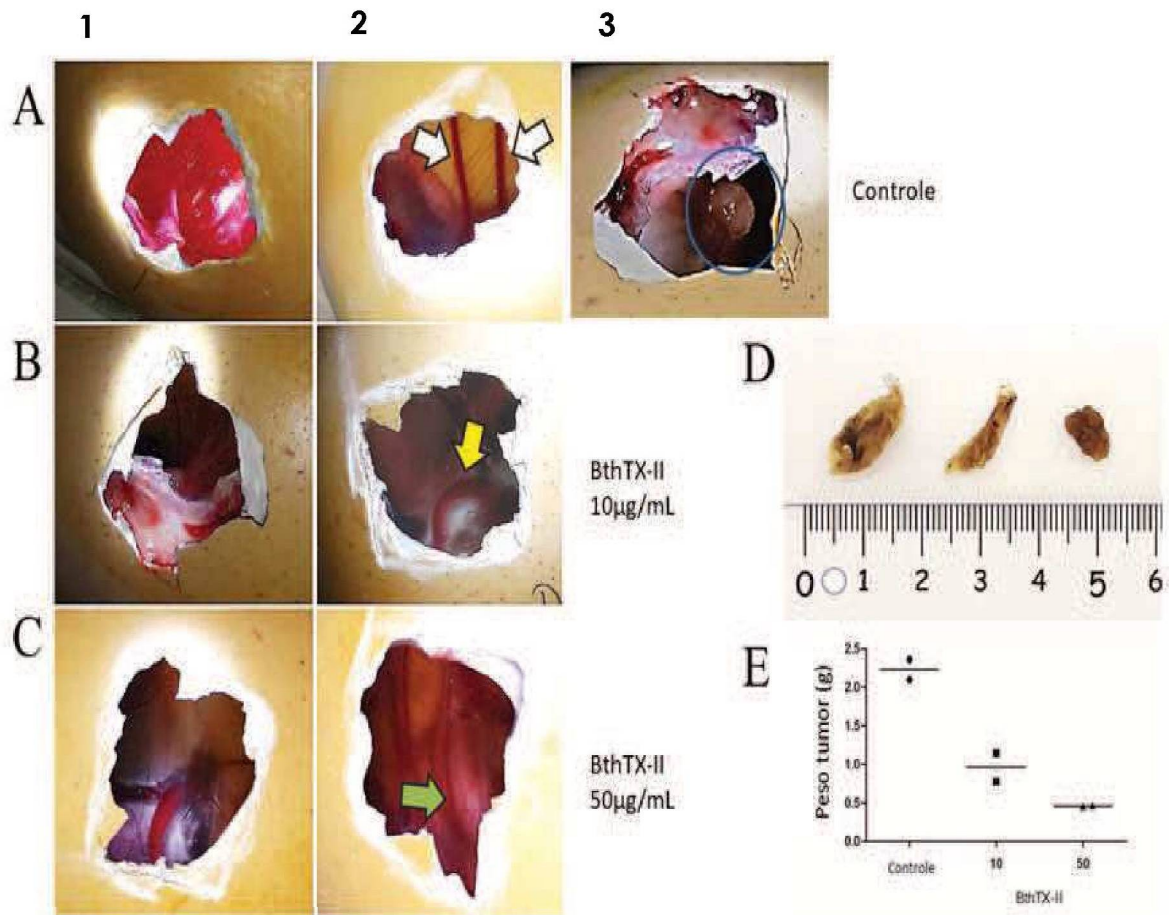
**FIGURA 15: INIBIÇÃO DA INVASÃO EM CO-CULTURA DE CÉLULAS TRATADAS COM BthTX-II.** Inibição da invasão de células em co-cultura MDA-MB-231 em matrigel-HUVEC em *transwell* e ação da BthTX-II (10 e 50 µg/mL) na presença ou não de estímulos com EGF e bFGF. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e os valores representam média ± S.D (n=3); diferenças comparada entre os tratamentos e o controle de célula sem co-cultura foram analisados pelo Two-way anova. Valores estatisticamente significativos foram representados por \*\*\*p<0,001.

#### **10.6. BthTX-II inibe a angiogênese tumoral *in vivo*, através do ensaio *Chick Chorioallantoic Membrane (CAM)*.**

Neste ensaio 25 matrizes de ovos de galinha fertilizados foram utilizados com 9 dias de vida do embrião em formação incubados com células TNBC. Durante a incubação, a viabilidade do embrião de galinha foi avaliada diariamente, como um pré-requisito para completar o experimento e verificar a viabilidade dos mesmos. Foi observado o crescimento tumoral em 18 ovos (72%). Após 3 dias de inoculação, demonstrado pela (figura 16A.2), representado pelas setas brancas mostra o desenvolvimento de novos vasos (seta branca fina) a partir dos pré-existentes (seta branca espessa), e na (figura 16A.3) circulado em azul, mostra o tumor já instalado e em estágio avançado, sendo a partir desse momento que foi iniciado o tratamento.

O tratamento com a BthTX-II (10 e 50 µg/ml) foi realizado todos os dias a partir do 4º dia de inoculação do tumor, sendo observado diariamente a formação dos vasos e o crescimento dos tumores. A figura 16B demonstra a redução dos vasos que nutrem o tumor e uma diminuição de 52% do peso tumoral para o tratamento com BthTX-II (10µg/ml). Houve uma redução no calibre dos vasos (Figura 16C), no tamanho dos tumores (Figura 16D) e do peso tumoral (Figura 16E) após tratamento. Como pode ser observado na figura 16E, o peso tumoral reduziu cerca de 52% e 82% em relação ao controle, após o tratamento com a BthTX-II 10 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente.





**FIGURA 16: ANGIOGÊNESE TUMORAL *IN VIVO*, METODO CAM. A1)** Controle e crescimento tumor, **A2)** Formação de novos vasos **A3)** Tumor desenvolvido **B1)** Início do tratamento com BthTX-II (10µg/ml) **B2)** Após 4 dias de tratamento com BthTX-II (10µg/ml) **C1)** Início do tratamento com BthTX-II (50µg/ml) **C2)** Após 4 dias tratamento com BthTX-II 50µg/ml). **D)** Foto redução tumoral após tratamento com BthTX-II representado e ordem pelo controle, 10 e 50µg/ml. **E)** Peso dos tumores em (g).

## 11. Discussão

Fosfolipases A<sub>2</sub> de peçonha de serpentes têm sido amplamente exploradas quanto ao seu potencial antitumoral (Calderon *et al.*, 2014; Azevedo *et al.*, 2016; Silva, Lopes, Teixeira, Gimenes, Azevedo, *et al.*, 2018). Estas proteínas apresentam alto potencial na terapia contra o câncer, uma vez que são capazes de reconhecer e atuarem em diferentes vias de morte, na inibição de processos como a invasão, proliferação e metástase do câncer (Prinholato Da Silva *et al.*, 2015; Azevedo *et al.*, 2016; Silva, Lopes, Teixeira, Gimenes, Azevedo, *et al.*, 2018).

Neste intuito, o presente trabalho apresenta o efeito antitumoral, antimetastático e a inibição da Transição Epitélio-Mesênquima (EMT) em células de tumor mamário altamente metastático (MDA-MB-231), bem como o efeito antiangiogênico *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* da PLA<sub>2</sub> BthTX-II, isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*. A BthTX-II, é uma PLA<sub>2</sub> Asp-49, básica, contendo 120 resíduos de aminoácidos com massa molecular de 13.976 Dalton (Dos Santos *et al.*, 2011). Esta proteína é capaz de induzir a agregação e secreção plaquetária, induz efeitos miotóxico, edematogênico e hemolítico (Murakami e Kudo, 2002; Murakami *et al.*, 2008).

O potencial antitumoral da BthTX-II foi inicialmente demonstrado através do efeito citotóxico da proteína sobre células de mama triplo negativas (MDA-MB-231) de maneira dose-dependente, (figura 4A) similarmente como já demonstrado para outra PLA<sub>2</sub> (BnSP- 6) isolada da peçonha de *B. pauloensis* (Azevedo *et al.*, 2016). O potencial citotóxico da BthTX-II foi significativamente menor em células MCF10A, uma linhagem de células da mama não-tumorigênica, indicando que BthTX-II possui efeitos antitumorais específicos sobre linhagens de câncer de mama. Corroborando com nossos resultados, a BthTX-I, uma PLA<sub>2</sub> Lys49 de *B. jararacussu* induziu citotoxicidade em uma

linhagem celular de câncer murino (S180), linhagem celular de melanoma de camundongo (B16F10) e linhagens de células Jurkat (Gebrim *et al.*, 2009), demonstrando potencial antitumoral na modulação de efeitos no ciclo celular e na redução da viabilidade de células da medula adrenal de rato (PC-12) e melanoma de camundongo (B16F10) (Prinholato Da Silva *et al.*, 2015). Além disso, BthTX-I foi capaz de induzir citotoxicidade dose-dependente em células de adenocarcinoma de mama humano (SKBR3)(Gebrim *et al.*, 2009).

A fim de investigar o mecanismo citotóxico induzido pela BthTX-II, averigamos os mecanismos de morte celular. Múltiplas interações têm sido descritas sugerindo interação entre os processos de apoptose, necrose e autofagia (Gump e Thorburn, 2011), A caracterização apoptótica, implica vários critérios, como alterações na morfologia nuclear, especialmente fragmentação e condensação da cromatina, e também a ocorrência de corpos apoptóticos que contêm material nuclear, bem como redução do volume celular e do encolhimento da membrana plasmática. Estímulos intrínsecos ou extrínsecos podem levar à apoptose, por meio de duas vias diferentes (Wang *et al.*, 2008). Inclusive tem-se levantado a questão do paradoxo que existe na interação entre o mecanismo apoptótico e autofágico e como o potencial terapêutico na autofagia pode ser importante para o tratamento do câncer de mama (Gump e Thorburn, 2011). Diversos autores descrevem a interação entre o mecanismo apoptótico e autofágico e demonstraram que as toxinas de peçonhas de serpente são capazes de ativar a autofagia e a apoptose no câncer de mama (Yan *et al.*, 2007; Kanematsu *et al.*, 2010; Azevedo *et al.*, 2016).

O efeito citotóxico da BthTX-II sobre células MDA-MB-231 pode estar correlacionado com a indução de apoptose e autofagia. A BthTX-II foi capaz de induzir a autofagia em células MDA-MB-231, mas não induziu esse efeito em células de mama (MCF10A), mostrando seletividade para o TNBC. A toxina também foi capaz de induzir

apoptose precoce e tardia em células MDA-MB-231 quando comparada ao controle, e foi capaz de modular a expressão de marcadores que caracterizam as vias de apoptose extrínseca e intrínseca, o gene fator de necrose tumoral (*TNF*) e o seu receptor *TNFRSF1A*, e os genes supressores de tumor *BRCA1* e *BRCA2*, *CASP8*, *BIRC5*, *MDM2* e *TP53*.

O gene *TP53* que codifica a proteína *P53*, um supressor tumoral, tem sido associado à expressão de genes pró-apoptóticos em células cancerígenas (Bourdon *et al.*, 2002). No trabalho de Azevedo e colaboradores (2016) foi demonstrado que a PLA<sub>2</sub> Lys49 (BnSP-6) foi capaz de induzir a apoptose precoce e tardia além de modular positivamente a expressão de diferentes genes relacionados à via da apoptose, como *TNF*, *TNFRSF10B*, *TNFRSF1A* e *CASP8*, e foi capaz de diminuir a expressão dos genes anti-apoptóticos *BCL2* e *BCL2L* (Azevedo *et al.*, 2016). Além das vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose foram investigados também a modulação de outros fatores, conhecidos como mediadores do processo de apoptose celular, como por exemplo a via do *p53*. A expressão da proteína *p53* (supressor tumoral) está relacionada com a ativação da expressão de genes pró-apoptóticos prevenindo assim a instalação e progressão do cancer (Nigro *et al.*, 1989; Bourdon *et al.*, 2002).

Um dos métodos mais confiáveis para estudar a morte celular é medir a fuga de componentes celulares de células cultivadas, quando a integridade da membrana é alterada e especialmente a medição de proteínas intracelulares (mais frequentemente enzimas) em sobrenadantes de culturas celulares, por isso o uso frequente desses ensaios para experimentos de descoberta de novas drogas. A lactato desidrogenase (LDH) é utilizada há muito tempo como um marcador de morte celular para modelos *in vitro*, uma vez que a LDH é liberada através do rompimento da membrana celular após a morte celular. (Flores *et al.*, 2019). Por isso, avaliamos a atividade da LDH no sobrenadante de

células MDA-MB-231 tratadas com BthTX-II. Este resultado pode justificar a presença de células apoptóticas necróticas ou tardias observadas no presente estudo. Esses achados corroboram os dados obtidos para BthTX-I, que promoveu a morte em várias linhagens celulares de câncer por apoptose e necrose (Prinholato Da Silva *et al.*, 2015).

Além da resistência a morte celular, Hanahan e Weinberg, 2011, descreveram seis eventos moleculares importantes e que estão envolvidos na carcinogênese. A ativação de vias proliferativas, é um dos eventos primordiais para a ativação dos processos de invasão, metástase e angiogênese (Hanahan e Weinberg, 2011). No presente estudo, demonstramos que a BthTX-II inibe a proliferação celular e promove a parada do ciclo celular em Sub-G0 em células TNBC. Nossos dados são consistentes com a literatura, a qual já demonstrou tais efeitos inibitórios de PLA<sub>2</sub> sobre a proliferação por 24, 48 e 72 h em células de cancer da mama MDA-MB-231 (Silva, Lopes, Teixeira, Gimenes, Azevedo, *et al.*, 2018). Além disso, diferentes componentes da peçonha de serpentes, como a macrovipecetina, uma lectina da peçonha de *Macrovipera lebetina*, induziu efeitos semelhantes como a inibição da proliferação, migração e a invasão de células de melanoma humano SK-MEL-28 (Hammouda *et al.*, 2018).

A fim de obter informações sobre a sobrevivência e proliferação de MDA-MB-231 após o tratamento com BthTX-II, a progressão do ciclo celular foi avaliado bem como a expressão de alguns genes nessa via. Além dos pontos de controle controlados internamente (*Checkpoints*), existem dois grupos de moléculas intracelulares que regulam o ciclo celular. Estas moléculas promovem o progresso da célula para a próxima fase (regulação positiva) ou param o ciclo (regulação negativa). Várias *Kinases* dependentes de ciclina (Cdks) e seus parceiros de ciclina (proteínas) que controlam a progressão do ciclo. Ciclinas do tipo D, em associação com *CDK4* e *CDK6*, promovem a transição da fase G1 para S pela fosforilação da proteína retinoblastoma (pRB), liberando assim o fator

de transcrição *E2F*, que levam à expressão de um subconjunto de genes alvo *E2F* associado à proliferação (Casimiro *et al.*, 2012). Além disso, a ciclina D1 é superexpressa em um subconjunto de cânceres humanos, incluindo câncer de mama (Fu *et al.*, 2004). De acordo com nossos dados, a análise do mecanismo do ciclo celular mostrou que a interrupção da fase sub-G0 induzida por BthTX-II foi mediada principalmente pela regulação negativa das proteínas reguladoras do ciclo celular *CDC25A*, *Ciclina D1*, *Ciclina E* e *E2F-1*. Esses resultados corroboram a inibição da proliferação e indução da apoptose observada neste trabalho após o tratamento com BthTX-II.

Algumas PLA<sub>2</sub>s de peçonha de serpentes também foram capazes de induzir uma mudança na distribuição do ciclo celular nas células cancerígenas. A BthTX-I, uma PLA<sub>2</sub> homóloga a utilizada em nosso estudo, modulou os efeitos no ciclo celular das células cancerígenas PC-12 e B16F10, promovendo assim um atraso na fase G0/G1 (Prinholato Da Silva *et al.*, 2015). A toxina da peçonha de serpente de *Vipera lebetina turanica* (SVT) inibiu o crescimento celular de células de câncer de próstata humano por induzir apoptose e parar o ciclo na fase G1-S com expressão decrescente de *kinase 4* dependente de ciclina, *Ciclina D1* e *Ciclina E* (Son *et al.*, 2007). E a BnSP-6 de *B. pauloensis*, promoveu parada significativa do ciclo celular na fase Sub-G1 com diminuição na fase G1 e aumento na fase G2 / M às 24 h pós-tratamento de células MDA-MB-231 (Silva, Lopes, Teixeira, Gimenes, Azevedo, *et al.*, 2018).

O processo metastático de células tumorais é considerado o evento de maior importância e um dos maiores responsáveis pelo aumento da malignidade no câncer. Este processo depende da capacidade dessas células em aderir, migrar e invadir outros tecidos (Hunter *et al.*, 2008). Nesse contexto, o efeito antimetastático apresentado pela BthTX-II em células MDA-MB-231 foi observado através da inibição da adesão celular, migração, invasão e crescimento 3D (*esferóides*), eventos importantes no processo metastático. O

tratamento com a BthTX-II também diminuiu a expressão de proteínas e genes de integrinas ( $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\alpha v \beta 3$ ). As integrinas são proteínas transmembrana heterodiméricas, pertencentes ao grupo de moléculas de adesão celular (CAMs), formadas por duas subunidades, as quais estão ligadas não covalentemente entre si, permite comunicação do citoesqueleto das células aos componentes da matriz extracelular (Ramovs *et al.*, 2017). Assim, as integrinas são componentes chave durante a adesão celular, migração e disseminação do processo metastático.

Acerbi (2015) relatou que a invasão e a progressão do câncer de mama humano estão correlacionadas com a ativação de elevados níveis de colágeno (Liu *et al.*, 2008; Desgrosellier e Cheresh, 2010). A integrina  $\beta 1$  suporta a migração celular, enquanto  $\alpha V$ - $\beta 3$  exerce papel importante na angiogênese tumoral e metástase. Notavelmente, como visto no experimento anterior, BthTX-II foi capaz de inibir a adesão na presença de colágeno e fibronectina, corroborando com os resultados encontrados com uma diminuição significativa da expressão de integrinas  $\beta 1$  e  $\alpha 2$ , que está associada à remodelação de colágeno por elevados fatores de crescimento (B., 2013; Acerbi *et al.*, 2015).

Bazza e colaboradores (2009) demonstraram que a MVL-PLA<sub>2</sub>, uma fosfolipase A<sub>2</sub> de *Macrovipera lebetina*, inibe eficientemente a adesão e migração de células tumorais, além de afetar a função destes receptores de adesão a substratos como fibrina e fibronectina através de integrinas  $\alpha v \beta 3$  e  $\alpha 5 \beta 1$  respectivamente (Bazaa *et al.*, 2009). Um outro estudo foi demonstrado pela PLA<sub>2</sub> CC-PLA<sub>2</sub>-1 e CC-PLA<sub>2</sub>-2 da peçonha de *Cerastes cerastes*, que inibiram de forma dose-dependente a adesão de melanoma IGR39 e células de fibrossarcoma HT1081k0 ao fibrinogênio e fibronectina (Bourdon *et al.*, 2002).

As matrizes extracelulares são constituídas por uma malha de diferentes combinações de colágenos, proteoglicanos, ácido hialurônico e várias glicoproteínas como a fibronectina e a laminina, que preenchem a maioria dos espaços intercelulares. A adesão das células vizinhas as matrizes extra-celulares determinam o seu formato, mantém a função celular adequada e a integridade do tecido (Lee *et al.*, 1997). A matriz extracelular também auxilia no ancoramento das células, sinaliza o tráfego, dirige a diferenciação celular, promovem a adesão e migração celular. Existem quatro classes principais de receptores celulares envolvidos nas interações célula-célula e célula-matriz: integrinas, selectinas, caderinas e a superfamília de receptores de imunoglobulinas (Ruoslahti *et al.*, 1987)

Em adição, como a transição epitélio-mesenquima (EMT) é um evento essencial no desenvolvimento da neoplasia invasiva e metastática do câncer, sendo considerada um dos marcadores do câncer (Feroni *et al.*, 2012), também demonstramos a modulação de alguns marcadores epiteliais e mesenquimais em células MDA-MB-231 após o tratamento com a BthTX-II. O tratamento diminuiu a expressão do gene *MCAM*, que é também conhecida como a molécula de superfície associada à metástase do melanoma, sendo posteriormente definida como um marcador de progressão do tumor e formação de metástases. Esta molécula é uma glicoproteína de membrana cálcio-independente, contem motivos responsáveis por reconhecer proteínas do tipo *Kinases*. Alguns estudos demonstraram que sua expressão quando exacerbada em diferentes linhagens de células tumorais está associada com os processos de progressão e metástase do câncer, além de ser identificado como indutor de EMT e de células tronco mesenquimais (Ishikawa *et al.*, 2014).

A BthTX-II diminuiu significativamente a expressão dos genes *TWIST1* e *CTNNB1*, esses genes contribuem para ativação do processo de metástase tumoral e são

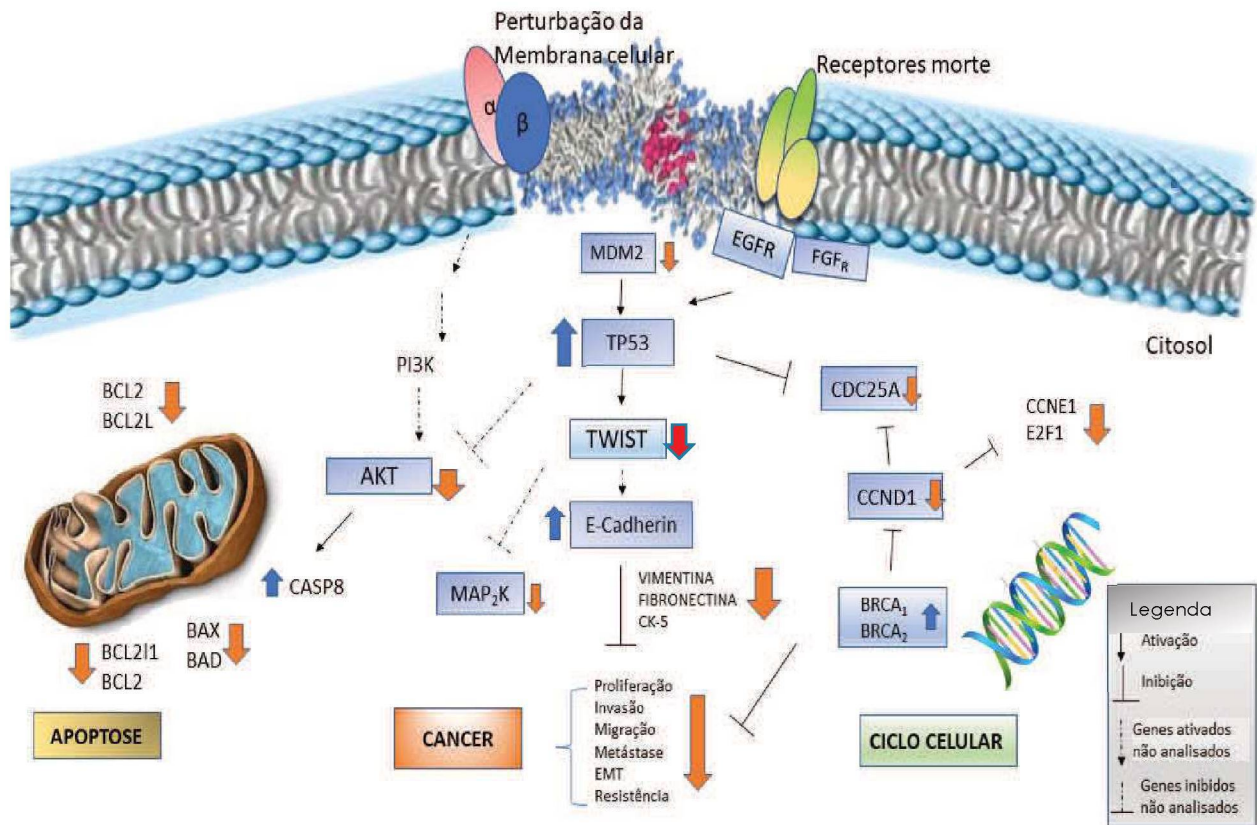


superexpressas em uma variedade de tumores (Zhu *et al.*, 2016). Por outro lado, a expressão do gene *CDHI* foi regulada positivamente e o nível da proteína E-caderina aumentou após tratamento com BthTX-II. A caderina-E é uma molécula chave para estabelecer as junções aderentes de células epiteliais que atuam para diminuir a agressividade das células TNBC, ou seja, inibir a EMT. A regulação negativa da caderina-E está associada a certas características malignas, incluindo progressão tumoral, perda de diferenciação, invasão e metástase e a estimulação da atividade da E-caderina na superfície celular, age de forma antagônica, ou seja, inibindo a progressão metastática (Shimoyama *et al.*, 1989; Petrova *et al.*, 2016).

Nossos resultados também demonstraram a redução da expressão de duas proteínas importantes para o desenvolvimento do processo metastático de células TNBC após o tratamento com BthTX-II: vimentina (um filamento tipo III que é expresso em células mesenquimais) e a proteína CK-5, responsável pelo pior prognóstico do câncer de mama triplo negativo (Abdelrahman *et al.*, 2017; Hashmi *et al.*, 2018; Orlandini *et al.*, 2018). Corroborando com nossos achados, Tsai (2016) relatou que o tratamento de células MDA-MB-231 com CTX III, um polipeptídeo básico isolado de *Naja-naja atra*, reduz os biomarcadores mesenquimais (vimentina e N-caderina), diminuiu a expressão de *SNAIL* e *TWIST1* e restaura o nível epitelial do biomarcador (E-caderina) em células MDA-MB-231 induzidas por EGF. Curiosamente, a BthTX-II também alterou estes biomarcadores em células MDA-MB-231 estimuladas com EGF, bem como em células sem estímulo de EGF após tratamento. Tsai (2016) associou esses efeitos à ativação a jusante do fosfatidilinositol 3-quinase (*PI3K*)/*AKT* e *ERK1/2* (Tsai *et al.*, 2013), sugerindo que a CTX III reverteu potentemente o processo de EMT nas células MDA-MB-231 (Tsai *et al.*, 2016a). Em nosso estudo, demonstramos a regulação negativa dos genes *AKT1* e

*AKT3* por BthTX-II em TNBC, sugerindo que esta PLA<sub>2</sub> também pode inibir metástases e EMT em células MDA-MB-231, interferindo na via (*PI3K*)/*AKT*.

A figura 17 apresenta de forma sintetizada, os principais efeitos induzidos pela BthTX-II durante a expressão de genes e proteínas envolvidos nas vias de sinalização que envolvem o ciclo celular, apoptose e no processo de metástase, em células MDA-MB-231. Resumidamente, sugerimos que esses efeitos podem iniciar após a interação da BthTX-II com receptores (crescimento epidérmico), fosfolipídeos ou integrinas da membrana (Lomonte *et al.*, 2003; Bazaa *et al.*, 2009; Silva, Lopes, Teixeira, Gimenes, Azevedo, *et al.*, 2018), presentes na superfície celular do TNBC interferindo na via *PI3K-AKT*, responsável pela manutenção da sobrevivência celular e pelo escape a apoptose. A regulação negativa de genes importantes, como *CDC25A*, *CCND1*, *CCNE1*, *E2F1* e *TWIST1*, bem como proteínas CK-5 e vimentina, também pode provocar a inibição do ciclo celular, proliferação, invasão e metástase, respectivamente. Em paralelo, a expressão do gene epitelial *CDH-1* (E-caderina) pode reforçar a inibição do fenótipo metastático, reduzindo assim a agressividade do TNBC. No entanto, apesar da relevância de nossos achados, a descoberta do alvo da BthTX-II em células MDA-MB-231 se faz necessário para o melhor entendimento de seu mecanismo antitumoral e antimetastático.



**Figura 17: DIFERENTES EFEITOS DA BTHTX-II SOBRE VIAS DE SINALIZAÇÃO.** Modelo representativo dos efeitos antimetastáticos e antitumorais da BthTX-II em uma célula de câncer de mama humana (MDA-MB-231). A BthTX-II interfere em diferentes genes e proteínas envolvidas na apoptose através da ativação e inibição do gene TP53, proteína tumoral p53; PI3K, fosfoinositido-3-quinase; AKT, serina / treonina quinase, Casp8, caspase 8; BAD / BAX. Associado aos agonistas de morte celular; Bcl2 / BCL2-L-Bcl-2 like; MAP2K, cascata de proteína quinase ativada por mitogeno; metástase e a transição epitelial-mesenquimal pela ativação de CDH-1, E-caderina, BRCA1 / 2 e inibição do gene CDC25A, fosfatases CDC25 de classe III Cys, CCNDI, ciclina D1, como início precoce da resposta ao ciclo celular. Setas azuis significam regulação positiva e setas laranja significam regulação negativa.

A metástase representa o ponto final de muitos eventos letais promovidos pelas células tumorais e a angiogênese desempenha um papel fundamental neste processo. A proliferação e a sobrevivência das células tumorais dependem dessa vasculatura para fornecer oxigênio e nutrientes adequados para o metabolismo celular tumoral. As redes

de comunicações que se estabelecem entre as células tumorais e as células não neoplásicas no microambiente de tumores primários desempenham papel crucial no crescimento e desenvolvimento das metástases, bem como na modulação de genes que atuam na diferenciação e invasão (Hobson e Denekamp, 1984; Gupta e Massague, 2006; Langley e Fidler, 2007).

O efeito antiangiogênico da BthTX-II foi avaliado inicialmente sobre células HUVECs. Neste contexto, quando as células foram tratadas com a BthTX-II (10 e 50  $\mu\text{g/ml}$ ) resultaram na diminuição da sua capacidade de adesão e migração, esse fato pode explicado devido a capacidade da toxina modular efeitos anti-angiogênicos, visto que resultados semelhantes já foram observados com outras toxinas de serpentes, como por exemplo a MVL-PLA<sub>2</sub> de *Macrovipera lebetina*, inibiu significativamente a angiogênese *in vitro* e *in vivo*, através da remodelação do citoesqueleto de actina e pela integrina  $\alpha 3\beta 3$  (Bazaa *et al.*, 2010). A desintegrina da peçonha de *cerastes cerastes* modulou efeitos antiangiogênico *in vitro* e *ex vivo* em ensaio modelo aorta e inibiu integrinas  $\alpha\beta 3$  e  $\alpha 5\beta 1$  (Ben-Mabrouk *et al.*, 2016).

Interessantemente, quando as células HUVEC foram cultivadas em monocamada para avaliação da inibição da adesão e migração, foi verificado um efeito menos expressivo da BthTX-II do que na redução da neo-angiogênese. Assim, a capacidade da BthTX-II em reduzir a formação de novos vasos foi verificada na presença do bFGF, fator de crescimento e proteína sinalizadora, codificada pelo gene *FGF*. Ele possui ampla atividade mitogênica e atua na sobrevivência celular (Kim, 1998; Skjerpen *et al.*, 2002).

Durante a invasão tumoral, ocorre a indução no crescimento dos vasos sanguíneos (angiogênese), através da secreção de bFGF, VEGF, entre outras proteínas. O bFGF está presente nas membranas basais e na matriz extracelular subendotelial dos vasos

sanguíneos e durante a invasão tumoral, ocorre indução no crescimento dos vasos sanguíneos e estimula todas as fases do crescimento de novos vasos sanguíneos: proliferação e migração de células endoteliais, a formação de um tubo capilar e a remodelação da rede vascular em órgãos (Skjerpen *et al.*, 2002; Tong e Yuan, 2008; Gacche e Meshram, 2014). Assim, quando na presença de bFGF a BthTX-II (10 e 50µg/mL), demonstrou sua capacidade em inibir a formação de novos vasos em células endoteliais humana (HUVECs) em matrigel (angiogênese *in vitro*).

Diversos estudos indicam que os ativadores angiogênicos desempenham um papel importante no crescimento e disseminação de tumores, e além disso, a correlação entre a expressão de VEGF e indução pelo bFGF estão altamente envolvidas na proliferação tumoral, transformação celular maligna e padrões aberrantes de vascularização corneana (Furudo *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2012). Resultados semelhantes a esses para as peçonhas de serpentes também foram observados. Uma cistatina recombinante, derivada de peçonha de serpente, apresentou efeito anti-angiogênico *in vitro* e *in vivo*, através da inibição de VEGF e bFGF (Xie *et al.*, 2013). Bothropoidina, uma metaloprotease de *B. pauloensis* diminuiu a viabilidade e adesão de células endoteliais em Matrigel e inibiu a angiogênese *in vitro* em Matrigel estimulado por bFGF (Guimaraes *et al.*, 2017).

Além da capacidade em diminuir adesão e migração em células endoteliais e inibição da formação de vasos, demonstrou a significativa redução dos níveis de VEGF, após o pré-tratamento com BthTX-II, produzidos pelas células endoteliais em matrigel, após estímulo com bFGF, sugerindo então, um possível mecanismo antiangiogênico induzido pela BthTX-II. Vale relatar que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) possui importante atividade pró-angiogênica, com efeito mitogênico e antiapoptótico nas células endoteliais. Ele tem capacidade de aumentar a permeabilidade

vascular e é responsável por estimular a proliferação e migração de células endoteliais durante o processo de angiogênese tumoral (Sasaki *et al.*, 2013; Melincovici *et al.*, 2018)

A fim de corroborar e reforçar os achados de inibição da formação de vasos *in vitro*, bem como avaliar a capacidade do endotélio em formar novos vasos (neo-angiogênese), neste estudo foi avaliado o comportamento aórtico (*ex vivo*) na formação de novos vasos, originado de um vaso pré-existente, a partir de brotamentos de células endoteliais. Fragmentos de aorta de camundongos Balb-c, cultivados em matrigel: bFGF por um período de 7 dias, exibiram formação de novos brotamentos e estrutura de microvasos endoteliais. Os resultados comprovaram que após o tratamento com a BthTX-II em todas as concentrações, houve redução da capacidade de formação de novos vasos a partir de vasos pré-existente, fato esse avaliado por um período de 7 dias, quando comparados com o controle sem tratamento. Em conjunto, esses estudos indicam que o endotélio intimal da aorta tem capacidade angioformativa completa e foi um dos principais contribuintes para o crescimento angiogênico (Silva *et al.*, 2008; Baker *et al.*, 2011; Gimenes *et al.*, 2017).

Brotos de microvasos endoteliais crescem a partir dos anéis e são percebidas 3 fases: crescimento, exponencial e regressão. Antes da fase de regressão, os anéis podem ser corados por meio de ensaios de imunofluorescência, cujo objetivo é de analisar a estrutura do vaso e brotamento (Fitzpatrick *et al.*, 2003; Baker *et al.*, 2011). Dessa forma, foram identificados em verde, brotos microvasculares de células conectadas a base do anel aórtico, e em contrapartida esses brotamentos não foram observados após o tratamento. O ensaio de formação vasos através anel aórtico (*aortic ring*), confirma o potencial anti-angiogênico da BthTX-II.

A formação de novos vasos ou túbulos *in vitro*, é um substituto para a angiogênese tumoral *in vivo*, como demonstramos até o momento, porém uma rede interligada mimetizando um microambiente tumoral *in vitro* é de extrema importância, para simular a angiogênese e assemelhar às condições *in vivo*, além de destacar que a comunicação intercelular desempenha um papel fundamental na progressão e invasão do câncer, provavelmente devido à vascularização do tecido tumoral e na modificação do comportamento celular, secretando uma variedade de fatores de crescimento, quimiocinas e proteases que desempenha papel direto na resistência as terapias direcionadas e recorrência dos tumores no câncer mama (Pinto *et al.*, 2014; Eiro *et al.*, 2018).

Em adição, analisamos em modelo de co-cultura angiogênese tumoral 3D que permite avaliar terapias antiangiogênica de forma mais direcionada. Células Endoteliais Vasculares de cordão Umbilical humano (HUVEC) cultivadas em co-cultura com células de mama triplo negativas MDA-MB-231 em matrigel transwell, demonstrou maior capacidade invasiva após co-cultivo. É importante salientar que esse co-cultivo estimulado com fatores de crescimento bFGF e EGF, tornam a célula TNBC com maior resistência e com maior capacidade invasiva ao endotélio vascular (Millette *et al.*, 2006; Sasaki *et al.*, 2013; Amann *et al.*, 2017).

A ação BthTX-II nas células (MDA-MB-231 e HUVEC) inibe significativamente os efeitos de invasão, representando mais de 60% dessa capacidade de inibição. Estudo obtidos com células de mama e células HUVEC em co-cultura endotélio-epitélio criado a partir de estruturas 3D foram avaliados de forma promissora usando cultura de células do estroma para estudar novos compostos antitumorais potenciais. Um estudo, com a BjuusuLAAO-II de *Bothrops jararacussu*, demonstrou efeito citotóxico e genotóxico em modelo de co-cultura de células HepG2-HUVEC (Machado *et al.*, 2019). Esses dados sugerem que os fatores liberados pelas células tumorais podem regular positivamente a

expressão dos receptores nas células endoteliais associadas ao tumor, e que as redes de comunicações que se estabelecem entre as células tumorais e as células não neoplásicas no microambiente de tumores primários desempenham um papel crucial no crescimento e desenvolvimento de metástases (Amann *et al.*, 2017; Eiro *et al.*, 2018).

A inibição do crescimento e angiogênese tumoral induzidos pela BthTx-II também foram analisados *in vivo* utilizando o modelo de membrana corioalantóide de embrião de galinha (CAM) (Chen *et al.*, 2013). Após o tratamento com BthTX-II (10 e 50 µg/ml) por período de 7 dias, o peso do tumor foi reduzido em 52% e 80% respectivamente, sendo importante relatar que no fim do experimento, todos os embriões estavam vivos e que o tratamento não foi tóxico para o embrião.

Os ensaios em CAM têm sido amplamente estudados em diversos tipos de cânceres como um alvo importante para suprimir sua proliferação, sobrevivência, metástase e angiogênese em tumores de glioma, osteossarcoma e carcinoma de colo; todos os estudos relatam a viabilidade de usar o embrião de galinha como um sistema modelo alternativo para analisar vários aspectos da biologia do tumor (Richardson e Singh, 2003; Strojnik *et al.*, 2010; Lokman *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2013).

Sabe-se que angiogênese fisiológica ocorre principalmente durante a embriogênese cuja função é acomodar os requisitos de desenvolvimento e, por esse motivo, apenas 0,01% das células epiteliais (ECs) sofrem divisão celular em adultos (Bielenberg e Zetter, 2015). No entanto, a angiogênese desempenha um papel crítico em uma variedade de condições patológicas como já relatamos e como no câncer é importante essa nova rede para nutrição. Porém quando essa oferta é insuficiente pode levar a apoptose ou necrose das células tumorais, dependendo da agressividade das cancerígenas e do ambiente que está inserido (Rajabi e Mousa, 2017). Portanto, o desenvolvimento de



novos agentes capazes de inibir essa angiogênese e reduzir a agressividade do câncer representa um novo paradigma na prevenção e tratamento do câncer.

## 12. Conclusão

O presente trabalho demonstrou pela primeira vez os efeitos antitumorais, antimetastáticos e antiangiogênicos da PLA<sub>2</sub> BthTX-II. Esta proteína foi capaz de induzir morte celular, inibir a proliferação, adesão, migração, invasão celular e crescimento de estruturas em 3D (mamosferas), reduzindo assim a agressividade das células TNBC. Além disso, a BthTX-II diminuiu a expressão de importantes genes e proteínas envolvidas no processo metastático dessas células como vimentina, *TWIST1*, CK-5 e possibilitou que após o tratamento houvesse um aumento significativo da expressão da proteína E-caderina bem como do seu gene (*CDH-1*), levando a célula triplo negativa a assumir um fenótipo epitelial diminuindo assim sua agressividade. A BthTX-II também foi capaz de inibir o crescimento de novos vasos *in vitro* e *ex vivo*, além de inibir a invasão e o crescimento em co-cultura de células HUVEC e MDA-MB-231. No modelo *in vivo* em embriões de galinha (CAM), a proteína foi capaz de reduzir a massa tumoral e o processo de angiogênese no ensaio de membrana (CAM). Diante dos efeitos, demonstramos o grande potencial da BthTX-II para compreensão do mecanismo de ação da fosfolipase A<sub>2</sub> no câncer de mama, evidenciando que os resultados advindos desse estudo sugerem que a BthTX-II pode se tornar um protótipo em potencial para o desenvolvimento de fármacos antitumorais na terapia contra o câncer de mama triplo negativo.



## Referências

ABDELRAHMAN, A. E. et al. Prognostic impact of EGFR and cytokeratin 5/6 immunohistochemical expression in triple-negative breast cancer. **Ann Diagn Pathol**, v. 28, p. 43-53, Jun 2017. ISSN 1532-8198 (Electronic) 1092-9134 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28648939> >. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2017.01.009>

ACERBI, I. et al. Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration. **Integr Biol (Camb)**, v. 7, n. 10, p. 1120-34, Oct 2015. ISSN 1757-9708 (Electronic) 1757-9694 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25959051> >. <https://doi.org/10.1039/c5ib00040h>

ALBERTS, B. J., A.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. . **Biologia Molecular da Céula**. Artmed, 2010.

ALLOULOU, A. et al. Phospholipases: an overview. **Methods Mol Biol**, v. 861, p. 63-85, 2012. ISSN 1064-3745. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_4)

AMANN, A. et al. Development of a 3D angiogenesis model to study tumour – endothelial cell interactions and the effects of anti-angiogenic drugs. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2963, 2017/06/07 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03010-6> >. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03010-6>

AMIR, S. et al. Regulation of the T-box transcription factor Tbx3 by the tumour suppressor microRNA-206 in breast cancer. **Br J Cancer**, v. 114, n. 10, p. 1125-34, May 10 2016. ISSN 1532-1827 (Electronic) 0007-0920 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27100732> >. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.73>

ANDRILAO-ESCARSO, S. H. et al. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A(2) from Bothrops jararacussu snake venom. **Biochem Pharmacol**, v. 64, n. 4, p. 723-32, Aug 15 2002. ISSN 0006-2952 (Print) 0006-2952. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01210-8](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01210-8)

ANDRILAO-ESCARSO, S. H. et al. Myotoxic phospholipases A(2) in bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from Bothrops jararacussu. **Biochimie**, v. 82, n. 8, p. 755-63, Aug 2000. ISSN 0300-9084 (Print) 0300-9084. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01150-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01150-0)

ANTHELME, R. J. C. A.-J. C. Recherches sur la Traitment du Câncer sur la Compression Methodique Simple ou Combinée et sure l'Histoire Generale de la Meme Maladie, suivies de notes 1°. sur les forces et la dynamétrie vitales; 2°. sur l'inflammation et l'état fébrile. In: (Ed.). **Neoplasms, Cancer**. 2 ed, v.2 ed., 1829. p.750.

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A2--a structural review. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p. 827-41, Aug 1996. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)00036-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00036-0)

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. ISSN 0141-8130. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.080>

B., W.-H. **The Role of Integrins in Cell Migration**. In: **Madame Curie Bioscience Database [Internet]**. . Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. , 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6613/> >.

BAKER, M. et al. Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. **Nat Protoc**, v. 7, n. 1, p. 89-104, Dec 22 2011. ISSN 1750-2799 (Electronic) 1750-2799 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22193302> >. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.435>

BALSINDE, J.; WINSTEAD, M. V.; DENNIS, E. A. Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. **FEBS Lett**, v. 531, n. 1, p. 2-6, Oct 30 2002. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12401193> >. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03413-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03413-0)

BAZAA, A. et al. MVL-PLA2, a phospholipase A2 from Macrovipera lebetina transmediterranea venom, inhibits tumor cells adhesion and migration. **Matrix Biol**, v. 28, n. 4, p. 188-93, May 2009. ISSN 0945-053x. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2009.03.007>

BAZAA, A. et al. MVL-PLA2, a snake venom phospholipase A2, inhibits angiogenesis through an increase in microtubule dynamics and disorganization of focal adhesions. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10124, Apr 12 2010. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20405031> >. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010124>

BEN-MABROUK, H. et al. CC5 and CC8, two homologous disintegrins from Cerastes cerastes venom, inhibit in vitro and ex vivo angiogenesis. **Int J Biol Macromol**, v. 86, p. 670-80, May 2016. ISSN 1879-0003 (Electronic) 0141-8130 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26853827> >. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.008>

BIANCONI, E. et al. An estimation of the number of cells in the human body. **Ann Hum Biol**, v. 40, n. 6, p. 463-71, Nov-Dec 2013. ISSN 1464-5033 (Electronic) 0301-4460 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23829164> >. <https://doi.org/10.3109/03014460.2013.807878>

BIELENBERG, D. R.; ZETTER, B. R. The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. **Cancer J**, v. 21, n. 4, p. 267-73, Jul-Aug 2015. ISSN 1540-336X (Electronic) 1528-9117 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26222078> >. <https://doi.org/10.1097/PPO.000000000000138>

BOGDANOVA, N.; HELBIG, S.; DORK, T. Hereditary breast cancer: ever more pieces to the polygenic puzzle. **Hered Cancer Clin Pract**, v. 11, n. 1, p. 12, 2013. ISSN 1731-2302 (Print) 1731-2302. <https://doi.org/10.1186/1897-4287-11-12>

BOURDON, J. C. et al. Scotin, a novel p53-inducible proapoptotic protein located in the ER and the nuclear membrane. **J Cell Biol**, v. 158, n. 2, p. 235-46, Jul 22 2002. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12135983> >. <https://doi.org/10.1083/jcb.200203006>

BOYD, J. Genetic predisposition to breast cancer: the next chapters. **Cancer**, v. 120, n. 7, p. 932-4, Apr 1 2014. ISSN 0008-543x. <https://doi.org/10.1002/cncr.28503>

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print) 0003-2697. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

BRAY F, J. F., SOERJOMATARAM I, SIEGEL RL, TORRE LA, JEMAL A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries., World Cancer Research fund, 2018. Disponível em: < <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/worldwide-cancer-data> >. Acesso em: may. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

BROWN, W. J.; CHAMBERS, K.; DOODY, A. Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. **Traffic**, v. 4, n. 4, p. 214-21, Apr 2003. ISSN 1398-9219 (Print) 1398-9219 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12694560> >. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00078.x>

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **J Lipid Res**, v. 50 Suppl, p. S237-42, Apr 2009. ISSN 0022-2275 (Print) 0022-2275. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800033-JLR200>

CALDERON, L. A. et al. Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 203639, 2014. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24683541> >. <https://doi.org/10.1155/2014/203639>

CAO, Z. et al. Jiedu Xiaozheng Yin, a Chinese herbal formula, inhibits tumor angiogenesis via downregulation of VEGF-A and VEGFR-2 expression in vivo and in vitro. **Oncol Rep**, v. 29, n. 3, p. 1080-6, Mar 2013. ISSN 1791-2431 (Electronic) 1021-335X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23254951> >. <https://doi.org/10.3892/or.2012.2202>

CARVALHO MHC, N. D., LEMOS VS, TOSTES RCA, FORTES ZB. o endotélio e suas múltiplas funções. **Rev Brasileira de Hipertensao**, v. 8, n. 1, p. 76-88, 2001.

CASIMIRO, M. C. et al. Cyclins and cell cycle control in cancer and disease. **Genes Cancer**, v. 3, n. 11-12, p. 649-57, Nov 2012. ISSN 1947-6019 (Print) 1947-6019 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23634253> >. <https://doi.org/10.1177/1947601913479022>

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. ISSN 1474-175X (Print) 1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14964308> >. <https://doi.org/10.1038/nrc1276>

CHAISAKUL, J. et al. Hypotensive and vascular relaxant effects of phospholipase A2 toxins from Papuan taipan (*Oxyuranus scutellatus*) venom. **Eur J Pharmacol**, v. 723, p. 227-33, Jan 15 2014. ISSN 1879-0712 (Electronic) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24296315> >. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.11.028>

CHAKRABORTI, S. Phospholipase A(2) isoforms: a perspective. **Cell Signal**, v. 15, n. 7, p. 637-65, Jul 2003. ISSN 0898-6568 (Print) 0898-6568 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12742226> >. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(02\)00144-4](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(02)00144-4)

CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 8, p. 563-72, Aug 2002. ISSN 1474-175X (Print) 1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12154349> >. <https://doi.org/10.1038/nrc865>

CHEANG, M. C. et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 101, n. 10, p. 736-50, May 20 2009. ISSN 0027-8874. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp082>

CHEANG, M. C. et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 5, p. 1368-76, Mar 1 2008. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18316557> >. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1658>

CHEN, Y. J. et al. Taiwan cobra phospholipase A2 suppresses ERK-mediated ADAM17 maturation, thus reducing secreted TNF-alpha production in human leukemia U937 cells. **Toxicon**, v. 86, p. 79-88, Aug 2014. ISSN 0041-0101. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.05.012>

CHEN, Z.; WEN, Z.; BAI, X. In vivo Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Angiogenesis Assays. **Bio-protocol**, v. 3, n. 18, p. e913, 2013/09/20 2013. ISSN 2331-8325. Disponível em: < <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.913> >. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.913>

CHINNAIYAN, A. M. et al. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. **Science**, v. 275, n. 5303, p. 1122-6, Feb 21 1997. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9027312> >. <https://doi.org/10.1126/science.275.5303.1122>

COLDITZ, G. A.; SELLERS, T. A.; TRAPIDO, E. Epidemiology - identifying the causes and preventability of cancer? **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 1, p. 75-83, Jan 2006. ISSN 1474-175X (Print) 1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16372016> >. <https://doi.org/10.1038/nrc1784>

CORREA, L. C. et al. Crystal structure of a myotoxic Asp49-phospholipase A2 with low catalytic activity: Insights into Ca<sup>2+</sup>-independent catalytic mechanism. **Biochim Biophys Acta**, v. 1784, n. 4, p. 591-9, Apr 2008. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18261474> >. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.01.007>

CORREA, L. C. et al. Preliminary X-ray crystallographic studies of BthTX-II, a myotoxic Asp49-phospholipase A2 with low catalytic activity from Bothrops jararacussu venom. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**, v. 62, n. Pt 8, p. 765-7, Aug 1 2006. ISSN 1744-3091. <https://doi.org/10.1107/S1744309106025164>

COUSSY, F. et al. [Biology of metastases and molecular mechanisms of their formation]. **Bull Cancer**, v. 106, n. 1, p. 24-36, Jan 2019. ISSN 1769-6917 (Electronic) 0007-4551 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30554635> >. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2018.11.010>

CURTIS, C. et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 346-52, Apr 18 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22522925> >.

DAVIS, J. M. **Basic Cell Culture: A Practical Approach**. 2 1994. 381 ISBN 0-19-963854-3 (hc); 0-19-963853-5 (pb). 2002.

DE COCK, J. M. et al. Inflammation Triggers Zeb1-Dependent Escape from Tumor Latency. **Cancer Res**, v. 76, n. 23, p. 6778-6784, Dec 1 2016. ISSN 1538-7445 (Electronic) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27530323> >. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0608>

DEBNATH, J.; BAEHRECKE, E. H.; KROEMER, G. Does autophagy contribute to cell death? **Autophagy**, v. 1, n. 2, p. 66-74, Jul 2005. ISSN 1554-8627 (Print) 1554-8627 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16874022> >. <https://doi.org/10.4161/auto.1.2.1738>

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. **J Biol Chem**, v. 269, n. 18, p. 13057-60, May 6 1994. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

DENNIS, E. A. et al. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chem Rev**, v. 111, n. 10, p. 6130-85, Oct 12 2011. ISSN 1520-6890 (Electronic) 0009-2665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21910409> >. <https://doi.org/10.1021/cr200085w>

DESGROSELLIER, J. S.; CHERESH, D. A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 1, p. 9-22, Jan 2010. ISSN 1474-1768 (Electronic) 1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20029421> >. <https://doi.org/10.1038/nrc2748>

DOS SANTOS, J. I. et al. Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A(2) class. **Proteins**, v. 79, n. 1, p. 61-78, Jan 2011. ISSN 0887-3585. <https://doi.org/10.1002/prot.22858>

DUBBS, C. A. Transverse gradient electrophoresis: protein homogeneity test and subfractionation technique. **Science**, v. 151, n. 3709, p. 463-4, Jan 28 1966. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5902392> >. <https://doi.org/10.1126/science.151.3709.463>

EIRO, N. et al. Cancer-associated fibroblasts affect breast cancer cell gene expression, invasion and angiogenesis. **Cell Oncol (Dordr)**, v. 41, n. 4, p. 369-378, Aug 2018. ISSN 2211-3436 (Electronic) 2211-3428 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29497991> >. <https://doi.org/10.1007/s13402-018-0371-y>

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 4, p. 495-516, Jun 2007. ISSN 0192-6233 (Print) 0192-6233 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17562483> >. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

ENGBRAATEN, O.; VOLLAN, H. K. M.; BORRESEN-DALE, A. L. Triple-negative breast cancer and the need for new therapeutic targets. **Am J Pathol**, v. 183, n. 4, p. 1064-1074, Oct 2013. ISSN 1525-2191 (Electronic) 0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23920327> >. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.05.033>

FELIPE LIMA, J. et al. EMT in Breast Carcinoma-A Review. **J Clin Med**, v. 5, n. 7, Jul 14 2016. ISSN 2077-0383 (Print) 2077-0383 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27429011> >. <https://doi.org/10.3390/jcm5070065>

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. ISSN 0020-7136. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>



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. ISSN 1474-175X (Print) 1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778135> >. <https://doi.org/10.1038/nrc1098>

FIDLER, I. J.; ELLIS, L. M. Neoplastic angiogenesis--not all blood vessels are created equal. **N Engl J Med**, v. 351, n. 3, p. 215-6, Jul 15 2004. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15254281> >. <https://doi.org/10.1056/NEJMp048080>

FILHO, G. B. **BOGLIOLO PATOLOGIA**. 8. 2006.

FITZPATRICK, T. E. et al. Inhibition of breast carcinoma and trophoblast cell invasiveness by vascular endothelial growth factor. **Exp Cell Res**, v. 283, n. 2, p. 247-55, Feb 15 2003. ISSN 0014-4827 (Print) 0014-4827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12581744> >.

FLORES, A. et al. Increased lactate dehydrogenase activity is dispensable in squamous carcinoma cells of origin. **Nat Commun**, v. 10, n. 1, p. 91, Jan 9 2019. ISSN 2041-1723 (Electronic) 2041-1723 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30626875> >. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07857-9>

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nat Med**, v. 1, n. 1, p. 27-31, Jan 1995. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956. <https://doi.org/10.1038/nm0195-27>

FORMIGLI, L. et al. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. **J Cell Physiol**, v. 182, n. 1, p. 41-9, Jan 2000. ISSN 0021-9541 (Print) 0021-9541 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10567915> >. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200001\)182:1<41::AID-JCP5>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200001)182:1<41::AID-JCP5>3.0.CO;2-7)

FORONI, C. et al. Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: role, molecular mechanisms and clinical impact. **Cancer Treat Rev**, v. 38, n. 6, p. 689-97, Oct 2012. ISSN 1532-1967 (Electronic) 0305-7372 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22118888> >. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.001>

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 Med**, v. 5, n. 1, p. 61-73, Jan 2016. ISSN 2045-7634 (Electronic) 2045-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26590118> >. <https://doi.org/10.1002/cam4.553>

FU, M. et al. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. **Endocrinology**, v. 145, n. 12, p. 5439-47, Dec 2004. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15331580> >. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0959>

FURUDOI, A. et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor C expression and angiogenesis at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma. **Oncology**, v. 62, n. 2, p. 157-66, 2002. ISSN 0030-2414 (Print) 0030-2414 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11914602> >. <https://doi.org/10.1159/000048262>

GACCHE, R. N.; MESHAM, R. J. Angiogenic factors as potential drug target: efficacy and limitations of anti-angiogenic therapy. **Biochim Biophys Acta**, v. 1846, n. 1, p. 161-79, Aug 2014. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24836679> >. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.05.002>

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. ISSN 1350-9047. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>

GARCIA, M. A.; NELSON, W. J.; CHAVEZ, N. Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 10, n. 4, Apr 2 2018. ISSN 1943-0264 (Electronic) 1943-0264 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28600395> >. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029181>

GEBRIM, L. C. et al. Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. **Biologicals**, v. 37, n. 4, p. 222-9, Aug 2009. ISSN 1045-1056. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.01.010>

GERNER RE, K. H., MOORE GE. . Studies of tumor cells lines derived from patients with malignant melanoma. **Oncology**, v. 31, p. 31-43, 1975. <https://doi.org/10.1159/000225003>

GEYER, C. E. et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. **N Engl J Med**, v. 355, n. 26, p. 2733-43, Dec 28 2006. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17192538> >.

GIJON, M. A.; LESLIE, C. C. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. **J Leukoc Biol**, v. 65, n. 3, p. 330-6, Mar 1999. ISSN 0741-5400 (Print) 0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10080535> >. <https://doi.org/10.1002/jlb.65.3.330>

GIMENES, S. N. C. et al. Antitumoral effects of gammaCdcPLI, a PLA2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* via PI3K/Akt pathway on MDA-MB-231 breast cancer cell. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 7077, Aug 1 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28765552> >. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07082-2>

GLOBOCAN, I. A. F. R. O. C.-I. New Global Cancer Data: GLOBOCAN 2018. **International Agency for Research on cancer**, september-2018 2019. Disponível em: < <http://gco.iarc.fr/> >. Acesso em: 02-02.

GOLDSMITH, J.; LEVINE, B.; DEBNATH, J. Autophagy and cancer metabolism. **Methods Enzymol**, v. 542, p. 25-57, 2014. ISSN 1557-7988 (Electronic) 0076-6879 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24862259> >. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416618-9.00002-9>

GREENBURG, G.; HAY, E. D. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. **J Cell Biol**, v. 95, n. 1, p. 333-9, Oct 1982. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7142291> >. <https://doi.org/10.1083/jcb.95.1.333>

GUIMARAES, D. O. et al. In vitro antitumor and antiangiogenic effects of Bothropoidin, a metalloproteinase from Bothrops pauloensis snake venom. **Int J Biol Macromol**, v. 97, p. 770-777, Apr 2017. ISSN 1879-0003 (Electronic) 0141-8130 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28093334> >. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.064>

GUMP, J. M.; THORBURN, A. Autophagy and apoptosis: what is the connection? **Trends Cell Biol**, v. 21, n. 7, p. 387-92, Jul 2011. ISSN 1879-3088 (Electronic) 0962-8924 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21561772> >. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.03.007>

GUO, W.; GIANCOTTI, F. G. Integrin signalling during tumour progression. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5, n. 10, p. 816-26, Oct 2004. ISSN 1471-0072 (Print) 1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15459662> >. <https://doi.org/10.1038/nrm1490>

GUPTA, D. et al. Effect of overexpression and nuclear translocation of constitutively active PKB-alpha on cellular survival and proliferation in HepG2 cells. **J Cell Biochem**, v. 93, n. 3, p. 513-25, Oct 15 2004. ISSN 0730-2312 (Print) 0730-2312 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15372623> >. <https://doi.org/10.1002/jcb.20200>

GUPTA, G. P.; MASSAGUE, J. Cancer metastasis: building a framework. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 679-95, Nov 17 2006. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17110329> >. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.001>

GUTIERREZ, J. M. et al. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A2 isolated from the venom of the snake Bothrops jararacussu. **Exp Mol Pathol**, v. 55, n. 3, p. 217-29, Dec 1991. ISSN 0014-4800 (Print) 0014-4800. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(91\)90002-F](https://doi.org/10.1016/0014-4800(91)90002-F)

HAMMOUDA, M. B. et al. Macrovipecetin, a C-type lectin from Macrovipera lebetina venom, inhibits proliferation migration and invasion of SK-MEL-28 human melanoma cells and enhances

their sensitivity to cisplatin. **Biochim Biophys Acta**, v. 1862, n. 3, p. 600-614, Mar 2018. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.11.019>

HAN, K. Y. et al. MT1-MMP modulates bFGF-induced VEGF-A expression in corneal fibroblasts. **Protein Pept Lett**, v. 19, n. 12, p. 1334-9, Dec 2012. ISSN 1875-5305 (Electronic) 0929-8665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22670674> >. <https://doi.org/10.2174/092986612803521639>

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

\_\_\_\_\_. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011. ISSN 0092-8674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HASHMI, A. A. et al. Cytokeratin 5/6 and cytokeratin 8/18 expression in triple negative breast cancers: clinicopathologic significance in South-Asian population. **BMC Res Notes**, v. 11, n. 1, p. 372, Jun 8 2018. ISSN 1756-0500 (Electronic) 1756-0500 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29884220> >. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3477-4>

HAY, E. D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. **Acta Anat (Basel)**, v. 154, n. 1, p. 8-20, 1995. ISSN 0001-5180 (Print) 0001-5180. <https://doi.org/10.1159/000147748>

\_\_\_\_\_. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. **Dev Dyn**, v. 233, n. 3, p. 706-20, Jul 2005. ISSN 1058-8388 (Print) 1058-8388. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20345>

HERSCHKOWITZ, J. I. et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biol**, v. 8, n. 5, p. R76, 2007. ISSN 1474-760X (Electronic) 1474-7596 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17493263> >. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-r76>

HOBSON, B.; DENEKAMP, J. Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. **Br J Cancer**, v. 49, n. 4, p. 405-13, Apr 1984. ISSN 0007-0920 (Print) 0007-0920 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6201181> >. <https://doi.org/10.1038/bjc.1984.66>

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. et al. Fractionation of Bothrops jararacussu snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 615-27, 1988. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90244-9](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90244-9)

HUANCAHUIRE-VEGA, S. et al. Biochemical and pharmacological characterization of PhTX-I a new myotoxic phospholipase A2 isolated from Porthidium hyoprora snake venom. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 154, n. 2, p. 108-19, Aug 2011. ISSN 1532-0456 (Print) 1532-0456. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.03.013>

HUNTER, K. W.; CRAWFORD, N. P.; ALSARRAJ, J. Mechanisms of metastasis. **Breast Cancer Res**, v. 10 Suppl 1, p. S2, 2008. ISSN 1465-542X (Electronic) 1465-5411 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19091006> >. <https://doi.org/10.1186/bcr1988>

INAGAKI, Y. et al. Des-gamma-carboxyprothrombin: clinical effectiveness and biochemical importance. **Biosci Trends**, v. 2, n. 2, p. 53-60, Apr 2008. ISSN 1881-7823 (Electronic) 1881-7815 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20103901> >.

INCA, I. N. D. C. Tipos de Câncer. 2014. Disponível em: < [www.inca.gov.br/](http://www.inca.gov.br/) >. Acesso em: Maio.

IRVIN, W. J., JR.; CAREY, L. A. What is triple-negative breast cancer? **Eur J Cancer**, v. 44, n. 18, p. 2799-805, Dec 2008. ISSN 1879-0852 (Electronic) 0959-8049 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19008097> >. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.09.034>

ISHIKAWA, T. et al. Laminins 411 and 421 differentially promote tumor cell migration via alpha6beta1 integrin and MCAM (CD146). **Matrix Biol**, v. 38, p. 69-83, Sep 2014. ISSN 1569-1802 (Electronic) 0945-053X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24951930> >. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.06.002>

JUNG, M. et al. Mast cells produce novel shorter forms of perlecan that contain functional endorepellin: a role in angiogenesis and wound healing. **J Biol Chem**, v. 288, n. 5, p. 3289-304, Feb 1 2013. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23235151> >. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.387811>

JUNQUEIRA, L. C. C., J.; ABRAHAMSOHN, P. **Histologia básica: texto e atlas**. . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 2017.

KALIA, M. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. **Metabolism**, v. 64, n. 3 Suppl 1, p. S16-21, Mar 2015. ISSN 0026-0495. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.027>

KALLURI, R.; NEILSON, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1776-84, Dec 2003. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14679171> >. <https://doi.org/10.1172/JCI20530>

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest**, v. 119, n. 6, p. 1420-8, Jun 2009. ISSN 0021-9738. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 5, p. 392-401, 05//print 2006. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1877> >. <https://doi.org/10.1038/nrc1877>

KANEMATSU, S. et al. Autophagy inhibition enhances sulforaphane-induced apoptosis in human breast cancer cells. **Anticancer Res**, v. 30, n. 9, p. 3381-90, Sep 2010. ISSN 1791-7530 (Electronic) 0250-7005 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20944112> >.

KARRETH, F. T., D. A. Twist induces an epithelial-mesenchymal transition to facilitate tumor metastasis. **Cancer Biol Ther**, v. 3, n. 11, p. 1058-9, Nov 2004. ISSN 1538-4047 (Print) 1538-4047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15640618> >. <https://doi.org/10.4161/cbt.3.11.1302>

KASHIMA, S. et al. Analysis of Bothrops jararacussu venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: l--gene expression profile of highly expressed phospholipases A2. **Biochimie**, v. 86, n. 3, p. 211-9, Mar 2004. ISSN 0300-9084 (Print) 0300-9084 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15134836> >. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.02.002>

KELLEHER, F. C.; FENNELLY, D.; RAFFERTY, M. Common critical pathways in embryogenesis and cancer. **Acta Oncol**, v. 45, n. 4, p. 375-88, 2006. ISSN 0284-186X (Print) 0284-186X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16760173> >. <https://doi.org/10.1080/02841860600602946>

KENIFIC, C. M. et al. NBR1 enables autophagy-dependent focal adhesion turnover. **J Cell Biol**, v. 212, n. 5, p. 577-90, Feb 29 2016. ISSN 1540-8140 (Electronic) 0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26903539> >. <https://doi.org/10.1083/jcb.201503075>

KENNECKE, H. et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 20, p. 3271-7, Jul 10 2010. ISSN 1527-7755 (Electronic) 0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20498394> >. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.9820>

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. ISSN 0007-0920 (Print) 0007-0920 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4561027> >. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>

KHALED, N.; BIDET, Y. New Insights into the Implication of Epigenetic Alterations in the EMT of Triple Negative Breast Cancer. **Cancers (Basel)**, v. 11, n. 4, Apr 18 2019. ISSN 2072-6694 (Print) 2072-6694 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31003528> >. <https://doi.org/10.3390/cancers11040559>

KIM, H. et al. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. **Nat Cell Biol**, v. 8, n. 12, p. 1348-58, Dec 2006. ISSN 1465-7392 (Print) 1465-7392 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17115033> >. <https://doi.org/10.1038/ncb1499>

KIM, H. S. Assignment1 of the human basic fibroblast growth factor gene FGF2 to chromosome 4 band q26 by radiation hybrid mapping. **Cytogenet Cell Genet**, v. 83, n. 1-2, p. 73, 1998. ISSN 0301-0171 (Print) 0301-0171 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9925931> >. <https://doi.org/10.1159/000015129>

KIM, J. et al. EGF induces epithelial-mesenchymal transition through phospho-Smad2/3-Snail signaling pathway in breast cancer cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 51, p. 85021-85032, Dec 20 2016. ISSN 1949-2553 (Electronic) 1949-2553 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27829223> >. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13116>

KIM, S. D.; YI, J. M.; PARK, M. T. Irradiated endothelial cells modulate the malignancy of liver cancer cells. **Oncol Lett**, v. 17, n. 2, p. 2187-2196, Feb 2019. ISSN 1792-1074 (Print) 1792-1074 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30675283> >.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-40, Dec 15 2003. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15019485> >. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.002>

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. ISSN 1474-1768 (Electronic) 1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18432252> >. <https://doi.org/10.1038/nrc2389>

KLIONSKY, D. J. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. **Autophagy**, v. 4, n. 6, p. 740-3, Aug 2008. ISSN 1554-8635 (Electronic) 1554-8627 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18567941> >. <https://doi.org/10.4161/auto.6398>

KROEMER, G.; JAATTELA, M. Lysosomes and autophagy in cell death control. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 11, p. 886-97, Nov 2005. ISSN 1474-175X (Print) 1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16239905> >. <https://doi.org/10.1038/nrc1738>

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A2 enzymes. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 68-69, p. 3-58, Aug 2002. ISSN 1098-8823 (Print) 1098-8823 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12432908> >. [https://doi.org/10.1016/S0090-6980\(02\)00020-5](https://doi.org/10.1016/S0090-6980(02)00020-5)

KURUPPU, S. et al. Neurotoxins from Australo-Papuan elapids: a biochemical and pharmacological perspective. **Crit Rev Toxicol**, v. 38, n. 1, p. 73-86, 2008. ISSN 1040-8444 (Print) 1040-8444 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18161503> >. <https://doi.org/10.1080/10408440701703964>

KUWANA, T. et al. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. **Mol Cell**, v. 17, n. 4, p.

525-35, Feb 18 2005. ISSN 1097-2765 (Print) 1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15721256> >.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.02.003>

KWEI, K. A. et al. Genomic instability in breast cancer: pathogenesis and clinical implications. **Mol Oncol**, v. 4, n. 3, p. 255-66, Jun 2010. ISSN 1878-0261 (Electronic) 1574-7891 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20434415> >.  
<https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.001>

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.  
<https://doi.org/10.1038/227680a0>

LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, p. 178, 02/21/online 2014. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/nrm3758> >.

LANGLEY, R. R.; FIDLER, I. J. Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. **Endocr Rev**, v. 28, n. 3, p. 297-321, May 2007. ISSN 0163-769X (Print) 0163-769X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17409287> >.  
<https://doi.org/10.1210/er.2006-0027>

LEE, J. M. et al. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. **J Cell Biol**, v. 172, n. 7, p. 973-81, Mar 27 2006. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.200601018>

LEE, S. et al. Transforming growth factor-beta regulation of bone morphogenetic protein-1/procollagen C-proteinase and related proteins in fibrogenic cells and keratinocytes. **J Biol Chem**, v. 272, n. 30, p. 19059-66, Jul 25 1997. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9228090> >.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.30.19059>

LIBRARY, H. U. **Contagion: Historical Views of Diseases and Epidemics**. Journal of American History. 101: 1357-1358 p. 2015. <https://doi.org/10.1093/jahist/jav106>

LIN, J. et al. Ursolic acid inhibits colorectal cancer angiogenesis through suppression of multiple signaling pathways. **Int J Oncol**, v. 43, n. 5, p. 1666-74, Nov 2013. ISSN 1791-2423 (Electronic) 1019-6439 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24042330> >.  
<https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2101>

LIU, Z.; WANG, F.; CHEN, X. **Integrin alpha(v)beta(3)-Targeted Cancer Therapy**. 2008. 329-339 ISBN 0272-4391 (Print) 0272-4391 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20628538> >.  
<https://doi.org/10.1002/ddr.20265>



LOKMAN, N. A. et al. Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 8, p. 9959-70, 2012. ISSN 1422-0067 (Electronic) 1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22949841> >. <https://doi.org/10.3390/ijms13089959>

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SANTAMARIA, C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A2 from snake venoms. **Toxicon**, v. 42, n. 3, p. 307-12, Sep 2003. ISSN 0041-0101 (Print) 0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14559083> >. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00149-1](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00149-1)

LORETO, C. et al. The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie's disease. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 616149, 2014. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25197653> >. <https://doi.org/10.1155/2014/616149>

MACHADO, A. R. T. et al. Cytotoxic, genotoxic, and oxidative stress-inducing effect of an l-amino acid oxidase isolated from Bothrops jararacussu venom in a co-culture model of HepG2 and HUVEC cells. **Int J Biol Macromol**, v. 127, p. 425-432, Apr 15 2019. ISSN 1879-0003 (Electronic) 0141-8130 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30654040> >. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.059>

MAGRO, A. J. et al. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A(2): quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 311, n. 3, p. 713-20, Nov 21 2003. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291x. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.10.047>

MANI, S. A. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell**, v. 133, n. 4, p. 704-15, May 16 2008. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18485877> >. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>

MEDICI, D.; KALLURI, R. Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype. **Semin Cancer Biol**, v. 22, n. 5-6, p. 379-84, Oct 2012. ISSN 1096-3650 (Electronic) 1044-579X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22554794> >. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.04.004>

MELINCOVICI, C. S. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. **Rom J Morphol Embryol**, v. 59, n. 2, p. 455-467, 2018. ISSN 1220-0522 (Print) 1220-0522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30173249> >.

MILLETTE, E. et al. Platelet-derived growth factor-BB transactivates the fibroblast growth factor receptor to induce proliferation in human smooth muscle cells. **Trends Cardiovasc Med**, v. 16,

n. 1, p. 25-8, Jan 2006. ISSN 1050-1738 (Print) 1050-1738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16387627> >. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2005.11.003>

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Phospholipase A2. **J Biochem**, v. 131, n. 3, p. 285-92, Mar 2002. ISSN 0021-924X (Print) 0021-924X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11872155> >. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003101>

MURAKAMI, M. T. et al. Biochemical and structural investigations of Bothropstoxin-II, a myotoxic Asp49 phospholipase A2 from Bothrops jararacussu venom. **Protein Pept Lett**, v. 15, n. 9, p. 1002-8, 2008. ISSN 0929-8665 (Print) 0929-8665. <https://doi.org/10.2174/092986608785849245>

MURRAY, M. R.; STOUT, A. P. The classification and diagnosis of human tumors by tissue culture methods. **Tex Rep Biol Med**, v. 12, n. 4, p. 898-915, 1954. ISSN 0040-4675 (Print) 0040-4675.

NIETO, M. A. The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 27, p. 347-76, 2011. ISSN 1530-8995 (Electronic) 1081-0706 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21740232> >. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154036>

NIGRO, J. M. et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. **Nature**, v. 342, n. 6250, p. 705-8, Dec 7 1989. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836. <https://doi.org/10.1038/342705a0>

NUNES, T.; BERNARDAZZI, C.; DE SOUZA, H. S. Cell death and inflammatory bowel diseases: apoptosis, necrosis, and autophagy in the intestinal epithelium. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 218493, 2014. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25126549> >. <https://doi.org/10.1155/2014/218493>

ODA, E. et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. **Science**, v. 288, n. 5468, p. 1053-8, May 12 2000. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10807576> >. <https://doi.org/10.1126/science.288.5468.1053>

OREN, M. Decision making by p53: life, death and cancer. **Cell Death And Differentiation**, v. 10, p. 431, 04/25/online 2003. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401183> >. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401183>

ORLANDINI, L. F. et al. Identification of a Subtype of Poorly Differentiated Invasive Ductal Carcinoma of the Breast Based on Vimentin and E-cadherin Expression. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 40, n. 12, p. 779-786, Dec 2018. ISSN 1806-9339 (Electronic) 0100-7203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30359996> >. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1673700>

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. ISSN 1365-2184 (Electronic) 0960-7722 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23030059> >. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x>

PAPETTI, M.; HERMAN, I. M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 282, n. 5, p. C947-70, May 2002. ISSN 0363-6143 (Print) 0363-6143 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11940508> >. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00389.2001>

PEPPER, M. S. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C synergizes with basic fibroblast growth factor and VEGF in the induction of angiogenesis in vitro and alters endothelial cell extracellular proteolytic activity. **Journal of Cellular Physiology**, v. 177, n. 3, p. 439-452, 1998. ISSN 0021-9541. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/%28SICI%291097-4652%28199812%29177%3A3%3C439%3A%3AAID-JCP7%3E3.0.CO%3B2-2> >.

PEREIRA, M. F. et al. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (Jararacucu) venom with low phospholipase A2 activity. **J Protein Chem**, v. 17, n. 4, p. 381-6, May 1998. ISSN 0277-8033 (Print) 0277-8033.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-752, 08/17/print 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/35021093> >. <https://doi.org/10.1038/35021093>

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-52, Aug 17 2000. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963602> >.

PETROVA, Y. I.; SCHECTERSON, L.; GUMBINER, B. M. Roles for E-cadherin cell surface regulation in cancer. **Mol Biol Cell**, v. 27, n. 21, p. 3233-3244, Nov 1 2016. ISSN 1939-4586 (Electronic) 1059-1524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27582386> >. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-01-0058>

PINTO, M. P. et al. Malignant stroma increases luminal breast cancer cell proliferation and angiogenesis through platelet-derived growth factor signaling. **BMC Cancer**, v. 14, p. 735, Oct 1 2014. ISSN 1471-2407 (Electronic) 1471-2407 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25274034> >. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-735>

PRINHOLATO DA SILVA, C. et al. Antitumor potential of the myotoxin BthTX-I from *Bothrops jararacussu* snake venom: evaluation of cell cycle alterations and death mechanisms induced in tumor cell lines. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 21, p. 44, 2015. ISSN 1678-9180. <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0044-5>

QUINN, M. T.; PARTHASARATHY, S.; STEINBERG, D. Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 8, p. 2805-2809, 1988. Disponível em: < <https://www.pnas.org/content/pnas/85/8/2805.full.pdf> >. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.8.2805>

RAJABI, M.; MOUSA, S. A. The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment. **Biomedicines**, v. 5, n. 2, Jun 21 2017. ISSN 2227-9059 (Print) 2227-9059 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28635679> >.

RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; ELLIS, I. O. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 120, n. 2, p. 293-308, Apr 2010. ISSN 1573-7217 (Electronic) 0167-6806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20107892> >. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0746-x>

RAMOVŠ, V.; TE MOLDER, L.; SONNENBERG, A. The opposing roles of laminin-binding integrins in cancer. **Matrix Biol**, v. 57-58, p. 213-243, Jan 2017. ISSN 0945-053x. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.08.007>

RANEIA, E. S. P. A. et al. Differential Macrophage Subsets in Muscle Damage Induced by a K49-PLA2 from Bothrops jararacussu Venom Modulate the Time Course of the Regeneration Process. **Inflammation**, May 23 2019. ISSN 1573-2576 (Electronic) 0360-3997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31123944> >.

RI., F. Culture of tumor tissue. In: Freshney RI. Culture of animal cells. **a manual of basic techniques**, v. 1, n. 3ed, p. 449-456, 1994.

RICHARDSON, M.; SINGH, G. Observations on the use of the avian chorioallantoic membrane (CAM) model in investigations into angiogenesis. **Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord**, v. 3, n. 2, p. 155-85, Jun 2003. ISSN 1568-0061 (Print) 1568-0061. <https://doi.org/10.2174/1568006033481492>

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v. 386, n. 6626, p. 671-4, Apr 17 1997. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9109485> >. <https://doi.org/10.1038/386671a0>

RITCHIE, M. R. A. H. Global Burden of Disease Collaborative Network. Global Burden of Disease Study 2016 (GBD 2016) Results. **Our World in Data - Cancer**, <https://ourworldindata.org/cancer#global-perspective-on-cancer-prevalence>, 2018 2018. Disponível em: < <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool> >. Acesso em: may.

ROLLI, M. et al. Activated integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 16, p.

9482-7, Aug 5 2003. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12874388> >. <https://doi.org/10.1073/pnas.1633689100>

RUOSLAHTI, E. et al. Purification and characterization of vitronectin. **Methods Enzymol**, v. 144, p. 430-7, 1987. ISSN 0076-6879 (Print) 0076-6879 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2442580> >. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)44192-X](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)44192-X)

SAITO, D. et al. Transforming growth factor-beta1 induces epithelial-mesenchymal transition and integrin alpha3beta1-mediated cell migration of HSC-4 human squamous cell carcinoma cells through Slug. **J Biochem**, v. 153, n. 3, p. 303-15, Mar 2013. ISSN 1756-2651 (Electronic) 0021-924X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23248240> >.

SAITO, R. F. L., M. V. G.; MEDRANO, R. F. V.; CHAMMAS, R. **Fundamentos de Oncologia Molecular**. 2015, 2016. 501 ISBN 978-85-388-0684-4. <https://doi.org/10.1093/jb/mvs144>

SÁNCHEZ, I. et al. Caspase-8 Is Required for Cell Death Induced by Expanded Polyglutamine Repeats. **Neuron**, v. 22, n. 3, p. 623-633, 1999. ISSN 0896-6273. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80716-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80716-3) >. Acesso em: 2019/04/18. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80716-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80716-3)

SANTOS, A. S. D. et al. Photobiomodulation of local alterations induced by BthTX-I, a phospholipase A2 myotoxin from Bothrops jararacussu snake venom: In vivo and in vitro evaluation. **Int J Biol Macromol**, v. 107, n. Pt B, p. 2020-2025, Feb 2018. ISSN 1879-0003 (Electronic) 0141-8130 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29037876> >. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.076>

SARRIO, D. et al. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. **Cancer Res**, v. 68, n. 4, p. 989-97, Feb 15 2008. ISSN 0008-5472. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2017>

SASAKI, T.; HIROKI, K.; YAMASHITA, Y. The role of epidermal growth factor receptor in cancer metastasis and microenvironment. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 546318, 2013. ISSN 2314-6141 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23986907> >. <https://doi.org/10.1155/2013/546318>

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys Acta**, v. 1761, n. 11, p. 1246-59, Nov 2006. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16973413> >. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2006.07.011>

SCOTT, D. L. et al. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. **Science**, v. 250, n. 4987, p. 1541-6, Dec 14 1990. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2274785> >. <https://doi.org/10.1126/science.2274785>

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. ISSN 0962-8924 (Print). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.12.006>

SHIMOYAMA, Y. et al. Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. **Cancer Res**, v. 49, n. 8, p. 2128-33, Apr 15 1989. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2702654> >.

SILVA, M. A. et al. Genotoxic effects of BnSP-6, a Lys-49 phospholipase A2 (PLA2) homologue from Bothrops pauloensis snake venom, on MDA-MB-231 breast cancer cells. **Int J Biol Macromol**, v. 118, n. Pt A, p. 311-319, Oct 15 2018. ISSN 1879-0003 (Electronic) 0141-8130 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29920366> >. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.082>

SILVA, M. A. et al. Genotoxic effects of BnSP-6, a Lys-49 phospholipase A2 (PLA2) homologue from Bothrops pauloensis snake venom, on MDA-MB-231 breast cancer cells. **Int J Biol Macromol**, Jun 16 2018. ISSN 0141-8130. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.082>

SILVA, R. et al. Integrins: the keys to unlocking angiogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 10, p. 1703-13, Oct 2008. ISSN 1524-4636 (Electronic) 1079-5642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18658045> >. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.172015>

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. **Biochim Biophys Acta**, v. 1488, n. 1-2, p. 1-19, Oct 31 2000. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00105-0](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00105-0)

SKJERPEN, C. S. et al. Binding of FGF-1 variants to protein kinase CK2 correlates with mitogenicity. **EMBO J**, v. 21, n. 15, p. 4058-69, Aug 1 2002. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12145206> >. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf402>

SOARES, A. M. et al. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A(2) homologue from Bothrops neuwiedi pauloensis venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 378, n. 2, p. 201-9, Jun 15 2000. ISSN 0003-9861 (Print) 0003-9861. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1790>

SON, D. J. et al. Inhibitory effect of snake venom toxin from Vipera lebetina turanica on hormone-refractory human prostate cancer cell growth: induction of apoptosis through inactivation of nuclear factor kappaB. **Mol Cancer Ther**, v. 6, n. 2, p. 675-83, Feb 2007. ISSN 1535-7163 (Print) 1535-7163. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0328>

SORLIE, T. Molecular classification of breast tumors: toward improved diagnostics and treatments. **Methods Mol Biol**, v. 360, p. 91-114, 2007. ISSN 1064-3745 (Print) 1064-3745 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17172726> >.

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. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>

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. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424. <https://doi.org/10.1073/pnas.0932692100>

SORLIE, T. et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. **BMC Genomics**, v. 7, p. 127, 2006. ISSN 1471-2164.

SOTIRIOU, C. et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 18, p. 10393-8, Sep 2 2003. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12917485> >. <https://doi.org/10.1073/pnas.1732912100>

STRANCAR, J. et al. SDSL-ESR-based protein structure characterization. **Eur Biophys J**, v. 39, n. 4, p. 499-511, Mar 2010. ISSN 1432-1017 (Electronic) 0175-7571 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19669752> >. <https://doi.org/10.1007/s00249-009-0510-5>

STROJNIK, T. et al. Experimental model and immunohistochemical comparison of U87 human glioblastoma cell xenografts on the chicken chorioallantoic membrane and in rat brains. **Anticancer Res**, v. 30, n. 12, p. 4851-60, Dec 2010. ISSN 0250-7005.

SU, Z. et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Mol Cancer**, v. 14, p. 48, Feb 21 2015. ISSN 1476-4598 (Electronic) 1476-4598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25743109> >. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0321-5>

SWAMINATHAN, S. et al. Vascular Endothelial–Breast Epithelial Cell Coculture Model Created from 3D Cell Structures. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 3, n. 11, p. 2999-3006, 2017/11/13 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00624> >. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00624>

TAKEBE, N.; WARREN, R. Q.; IVY, S. P. Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. **Breast Cancer Res**, v. 13, n. 3, p. 211, Jun 10 2011. ISSN 1465-542X (Electronic) 1465-5411 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21672282> >. <https://doi.org/10.1186/bcr2876>

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. ISSN 1538-7445 (Electronic) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20610625> >. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1040>

TEIXEIRA, L. A. et al. **De doença desconhecida a problema de saúde pública : o INCA e o controle do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz Instituto Nacional de Câncer, Divisão de Comunicação Social, 2007. 169 p. ISBN 9788533414464.

THIERY, J. P. et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 871-90, Nov 25 2009. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19945376> >. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>

TONG, S.; YUAN, F. Dose response of angiogenesis to basic fibroblast growth factor in rat corneal pocket assay: I. Experimental characterizations. **Microvasc Res**, v. 75, n. 1, p. 10-5, Jan 2008. ISSN 0026-2862 (Print) 0026-2862 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17706726> >. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2007.06.002>

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 9, p. 4350-4, Sep 1979. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>

TSAI, J. H.; YANG, J. Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. **Genes Dev**, v. 27, n. 20, p. 2192-206, Oct 15 2013. ISSN 1549-5477 (Electronic) 0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24142872> >. <https://doi.org/10.1101/gad.225334.113>

TSAI, P. C. et al. Inhibition of Src activation with cardiotoxin III blocks migration and invasion of MDA-MB-231 cells. **Toxicon**, v. 74, p. 56-67, Nov 2013. ISSN 1879-3150 (Electronic) 0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23933586> >. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.07.021>

TSAI, P. C. et al. Cardiotoxin III Inhibits Hepatocyte Growth Factor-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition and Suppresses Invasion of MDA-MB-231 Cells. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 30, n. 1, p. 12-21, Jan 2016a. ISSN 1099-0461 (Electronic) 1095-6670 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26277884> >. <https://doi.org/10.1002/jbt.21735>

\_\_\_\_\_. Taiwan cobra cardiotoxin III suppresses EGF/EGFR-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of human breast cancer MDA-MB-231 cells. **Toxicon**, v. 111, p. 108-20, Mar 1 2016b. ISSN 0041-0101. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.01.051>

URRA, F. A.; ARAYA-MATURANA, R. Targeting Metastasis with Snake Toxins: Molecular Mechanisms. v. 9, n. 12, Nov 30 2017. ISSN 2072-6651. <https://doi.org/10.3390/toxins9120390>



VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1488, n. 1-2, p. 59-70, Oct 31 2000. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11080677> >. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00110-4](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00110-4)

VODUC, K. D. et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 10, p. 1684-91, Apr 1 2010. ISSN 1527-7755 (Electronic) 0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20194857> >. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.9284>

WANG, L.; DU, F.; WANG, X. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. **Cell**, v. 133, n. 4, p. 693-703, May 16 2008. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18485876> >. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.036>

WANG, Z. et al. Integrin alpha9 depletion promotes beta-catenin degradation to suppress triple negative breast cancer tumor growth and metastasis. Apr 22 2019. ISSN 0020-7136. <https://doi.org/10.1002/ijc.32359>

WEIGELT, B. et al. Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 26, p. 15901-5, Dec 23 2003. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14665696> >. <https://doi.org/10.1073/pnas.2634067100>

WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.; VAN 'T VEER, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 8, p. 591-602, Aug 2005. ISSN 1474-175X (Print) 1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16056258> >. <https://doi.org/10.1038/nrc1670>

WEIS, S. M.; CHERESH, D. A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. **Nat Med**, v. 17, n. 11, p. 1359-70, Nov 7 2011. ISSN 1546-170X (Electronic) 1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22064426> >. <https://doi.org/10.1038/nm.2537>

WENDT, M. K. et al. Down-regulation of epithelial cadherin is required to initiate metastatic outgrowth of breast cancer. **Mol Biol Cell**, v. 22, n. 14, p. 2423-35, Jul 15 2011. ISSN 1939-4586 (Electronic) 1059-1524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21613543> >. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-04-0306>

WHO, W. H. O.-. Breast cancer: prevention and control. 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html> >. Acesso em: 25 junho.

\_\_\_\_\_. cancer- Breast cancer. 2018. Disponível em: < <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/> >. Acesso em: march, 29.

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. ISSN 1949-2553. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2792>

WOLFF, A. C. et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 31, p. 3997-4013, Nov 1 2013. ISSN 1527-7755 (Electronic) 0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24101045> >.

XIE, Q. et al. Recombinant snake venom cystatin inhibits tumor angiogenesis in vitro and in vivo associated with downregulation of VEGF-A165, Flt-1 and bFGF. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 13, n. 4, p. 663-71, May 2013. ISSN 1875-5992 (Electronic) 1871-5206 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23094915> >. <https://doi.org/10.2174/1871520611313040015>

YAN, C. H. et al. Autophagy is involved in cytotoxic effects of crotoxin in human breast cancer cell line MCF-7 cells. **Acta Pharmacol Sin**, v. 28, n. 4, p. 540-8, Apr 2007. ISSN 1671-4083 (Print) 1671-4083 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17376294> >. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00530.x>

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. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.006>

YANG, L. et al. FZD7 has a critical role in cell proliferation in triple negative breast cancer. **Oncogene**, v. 30, n. 43, p. 4437-46, Oct 27 2011. ISSN 0950-9232. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.145>

YU, B. Z. et al. Catalytic significance of the specificity of divalent cations as KS\* and kcat\* cofactors for secreted phospholipase A2. **Biochemistry**, v. 37, n. 36, p. 12576-87, Sep 8 1998. ISSN 0006-2960 (Print) 0006-2960 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9730830> >. <https://doi.org/10.1021/bi9728607>

ZHU, Q. Q. et al. The role of TWIST1 in epithelial-mesenchymal transition and cancers. **Tumour Biol**, v. 37, n. 1, p. 185-97, Jan 2016. ISSN 1423-0380 (Electronic) 1010-4283 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26602382> >. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4450-7>

ZOIA, M. A. P. et al. Inhibition of Triple-Negative Breast Cancer Cell Aggressiveness by Cathepsin D Blockage: Role of Annexin A1. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 6, Mar 16 2019. ISSN 1422-0067

(Electronic) 1422-0067 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30884823> >. <https://doi.org/10.3390/ijms20061337>

ZOUARI-KESENTINI, R. et al. Antitumoral potential of Tunisian snake venoms secreted phospholipases A2. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 391389, 2013.  
<https://doi.org/10.1155/2013/391389>

## *Anexo 01- Contribuições durante o doutorado*

---

### *Artigos publicados*



*Anexo 02*

---

*Capítulos de livros*

*Anexo 03*

---

*Patentes depositadas INPI*