

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Atividade anti-angiogênica da fosfolipase A₂ (PLA₂ Lys-49) BnSP-7 isolada da
peçonha de *Bothrops pauloensis*

Eloá Cunha de Moura

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG

Dezembro de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Atividade anti-angiogênica da fosfolipase A₂ (PLA₂ Lys-49) BnSP-7 isolada da
peçonha de *Bothrops pauloensis*

Eloá Cunha de Moura

Prof^ª. Dr^ª. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG

Dezembro de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Atividade anti-angiogênica da fosfolipase A₂ (PLA₂ Lys-49) BnSP-7 isolada da
peçonha de *Bothrops pauloensis*

Eloá Cunha de Moura

Prof^{ta}. Dr^a. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Instituto de Genética e Bioquímica

Homologado pela coordenação do Curso

de Ciências Biológicas em __/__/__

Prof. Dr. Oswaldo Marçal Júnior

Uberlândia - MG

Dezembro de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Atividade anti-angiogênica da fosfolipase A₂ (PLA₂ Lys-49) BnSP-7 isolada da
peçonha de *Bothrops pauloensis*

Eloá Cunha de Moura

Aprovado pela Banca Examinadora em: 9 / 12 / 2016 Nota: 90

Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, 9 de dezembro de 2016

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Rosilaine e Célio, a minha avó, Waldivina, a minha irmã, Tainá, e ao meu namorado Rafael.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço à Profa Dra Veridiana de Melo Rodrigues Ávila por ter criado em mim o encanto e interesse que tenho pela Bioquímica, sendo a excelente professora que ela é, bem como por ter me aceitado e recebido no laboratório como sua orientanda.

Também gostaria de agradecer à Dra Daiana Silva Lopes por ter me recebido, ensinado os protocolos do laboratório, e por sempre ser solícita e prestativa nos momentos que precisei.

Agradeço a Sara Gimenes por sua enorme paciência e amizade, estando lá sempre que precisava. Sempre me ajudando com tudo, com sua marcante atenção e conhecimento.

Agradeço, igualmente, à Marina por sempre nos socorrer quando os assuntos envolviam química e matemática, por evitar desastres nos auxiliando com a manipulação de ácidos e pela sua companhia constante.

Sou muita grata a toda equipe do laboratório, pois todos, de uma forma ou de outra, me ajudaram a chegar até aqui, nesse importante momento da minha vida.

Gostaria de agradecer aos meus pais e à minha avó por serem os responsáveis por eu ter me tornado tudo o que sou hoje e por sempre estarem presentes em minha, à minha irmã por seu companheirismo e amizade de sempre e ao meu namorado por estar sempre presente, me ouvindo, ajudando, aconselhando e acalmando.

Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer especialmente à Patrícia, ao Vitor e ao Cuevas por suas amizades, companheirismos, solidariedade, ajuda e por serem quem eles são. Por trazerem risadas e bom humor nos dias mais difíceis e por sempre serem verdadeiros comigo. Tudo teria sido mais árduo sem vocês.

RESUMO

A angiogênese é um processo fisiológico de grande importância na progressão de doenças denominadas doenças dependentes de angiogênese, que são retinopatias, degeneração macular e tumores. Desta forma, compostos que inibem a angiogênese possuem interesse farmacêutico devido ao seu potencial terapêutico. No presente estudo, a atividade anti-angiogênica da BnSP-7, uma fosfolipase A₂ Lys 49 previamente isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, foi avaliada em células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC). Inicialmente foi demonstrado que a BnSP-7 não apresentou citotoxicidade sobre células HUVEC em concentrações de 100 a 1,56 ug/mL, porém foi capaz de inibir a proliferação celular em uma maneira dose (40 a 5 ug/mL) e tempo (24, 48 e 72 horas) dependentes quando os ensaios foram realizados ambos pelo método do MTT. BnSP-7 inibiu satisfatoriamente a adesão celular de HUVECs a alguns componentes da matriz extracelular (fibronectina, colágeno e matrigel) bem como foi capaz de inibir a migração e a formação de vasos *in vitro* induzida por bFGF, em matrigel e transwell, respectivamente. Tais resultados demonstram que a BnSP-7 pode ser um modelo farmacológico para diversas doenças.

Palavras-chave: angiogênese, tumor, PLA₂

Sumário

1. Introdução	1
2. Objetivos	13
2.1 Objetivos Específicos	13
3. Materiais e Métodos	14
3.1 Obtenção da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i>	14
3.2 Obtenção da PLA ₂ BnSP-7	14
3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE)	15
3.4 Cultura de Células	15
3.5 Ensaio de Viabilidade	16
3.6 Ensaio de Proliferação	16
3.7 Inibição da adesão na presença de diferentes substratos	17
3.8 Inibição da migração celular em <i>transwell</i>	18
3.9 Inibição da Angiogênese <i>in vitro</i> induzida por bFGF por ensaio de matrigel	18
3.10 Análise Estatística	19
4. Resultados	20
4.1 Obtenção da PLA ₂ BnSP-7	20
4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida	21
4.3 Ensaio de Viabilidade por MTT	22
4.4 Inibição da Proliferação Celular	23
4.5 Inibição da adesão de HUVEC em diferentes substratos (fibronectina, colágeno e matrigel)	24
4.6 Inibição da migração de HUVEC em <i>transwell</i>	25
4.7 Inibição da Angiogênese <i>in vitro</i> induzida por bFGF por ensaio de matrigel	26
5. Discussão	27
6. Conclusão	31
7. Referências Bibliográficas	32

LISTA DE ABREVIATURAS

1. AKT – Proteína quinase B
2. ATCC - American Type Culture Collection
3. bFGF – Fator de crescimento de fibroblasto básico
4. EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
5. ERK – Quinase relacionada com sinal extracelular
6. HIF - Fator induzido por hipoxia
7. HUVEC – Células endoteliais de cordão umbilical humano
8. MAPK – Proteína quinase mitógeno ativada
9. MTT - (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
10. PBS – Tampão fosfato salino
11. PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas
12. PI3K – Fosfatidilinositol 3 quinase
13. PKC – Proteína quinase C
14. PLA₂ – Fosfolipase A₂
15. SDS – Dodecilsulfato de sódio
16. SFB – Soro fetal bovino
17. TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
18. VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial
19. VEGFR2 - Receptor 2 de fator de crescimento vascular endotelial

1. Introdução

Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir dos vasos existentes (FOLKMAN, 1971) (Figura 1). É um processo importante para diversas situações fisiológicas do organismo como, o ciclo menstrual, gravidez, cicatrização de feridas e em casos de fraturas ósseas (DHANANJAYA e SIVASHANKARI, 2015). Para que a angiogênese ocorra é necessário o desequilíbrio entre fatores pró e anti-angiogênicos (BERGES e BENJAMIN, 2006). Fatores de estresse celular como hipoxia, falta de nutrientes e baixo pH são estimulantes para a sinalização angiogênica. Fatores angiogênicos se ligam a receptores presentes na superfície das células endoteliais iniciando assim, uma cascata de sinalização que irá induzir a proliferação, migração e a formação de novos capilares, além de promover a liberação de proteases que irão degradar a matriz extracelular. O processo da angiogênese possui diversas etapas: aumento da permeabilidade vascular, remoção dos pericitos, degradação da matriz extracelular, migração e proliferação das células endoteliais, formação dos tubos, maturação celular e recrutamento de pericitos (CARMELIET, 2000; HANAHNA e FOLKMAN, 2000).

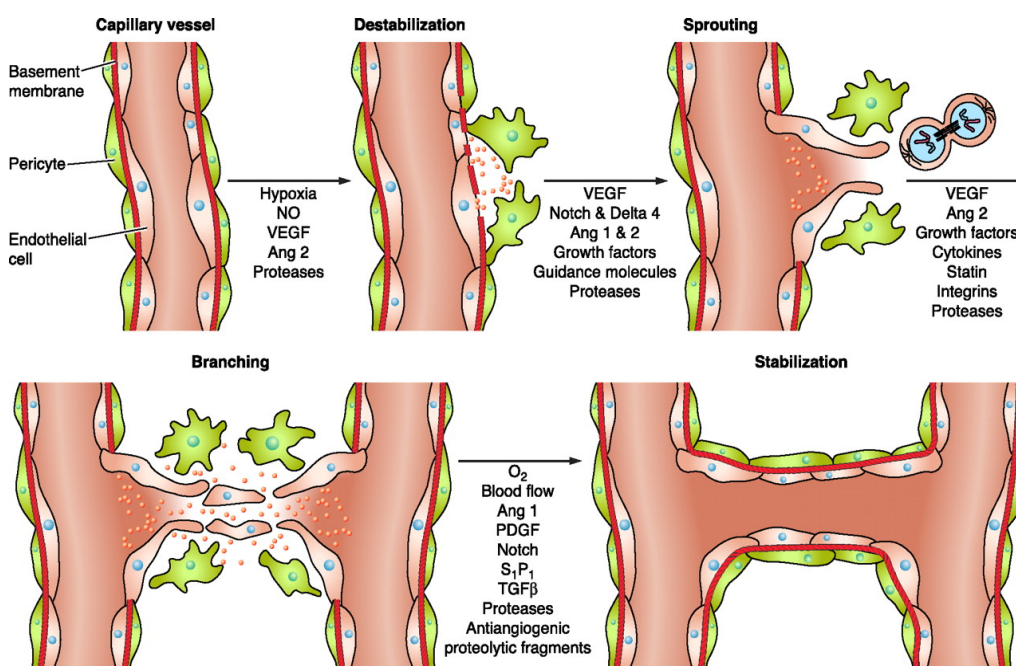


Figura 1: Processos celulares da angiogênese (CLAPP et al., 2009).

O VEGF é o fator pró-angiogênico mais estudado e apresenta grande importância na angiogênese de processos fisiológicos normais e em doenças. Ele é um dos principais responsáveis pela proliferação e formação de tubos (RINI e SMALL, 2005). Para que a angiogênese ocorra é necessária a expressão de fatores pro-angiogênicos e moléculas que irão participar da degradação da matriz extracelular, como as metaloproteinases. Em condições de hipoxia, isto é baixa concentração de oxigênio, células endoteliais irão expressar HIF, resultando na expressão de VEGFA e VEGFR2, o principal receptor de VEGFA (TANG, N. *et al.*, 2004). Células presentes no estroma, como fibroblastos, por exemplo, e células inflamatórias, como mastócitos, e plaquetas também irão expressar fatores pro-angiogênicos, sendo os principais, VEGFA, TNF- α , PDGF, bFGF (BANKS, R. E. *et al.*, 2005; GRUNEWALD, M. *et al.*, 2006; HUGHES, C. C., 2008;). O aumento na expressão de VEGFA ativa diversas vias de sinalização, entre elas: PI3K/Akt, MAPK e a via de sinalização do cálcio, que irão promover a permeabilidade, sobrevivência, proliferação e migração das células endoteliais, e também induzem a expressão de metaloproteinases, que irão degradar componentes da matriz extracelular. Tais vias também participam da ativação de fosfolipases A₂ presentes no citoplasma celular e induzem a expressão de ciclooxigenase (COX2), enzima que irá produzir prostaglandinas, as quais induzem a expressão do VEGF, aumentando sua concentração e induzindo a angiogênese (SONOSHITA, TAKAKU, SASAKI, *et al.*, 2001; SENO, OSHIMA, ISHIKAWA, *et al.*, 2002; WENDUM, *et al.*, 2005; WANG, DUBOIS, 2010). A angiogênese fisiológica aparentemente é dependente da sinalização por VEGFA, já a angiogênese tumoral não é dependente desta, conseguindo substituí-la por outros fatores pro-angiogênicos tendo em vista que eles ativam as mesmas vias de sinalização (EBOS *et al.*, 2009).

A formação de novos capilares possui papel importante em algumas doenças classificadas como, doenças-dependentes de angiogênese, isto é, elas dependem da ocorrência

da angiogênese para progredir, incluem tumores, retinopatias e degeneração macular, as duas últimas podem comprometer parcialmente ou totalmente a visão (WANG e ADAMIS, 1998; TÍMAR et al, 2001) (Figura 2).

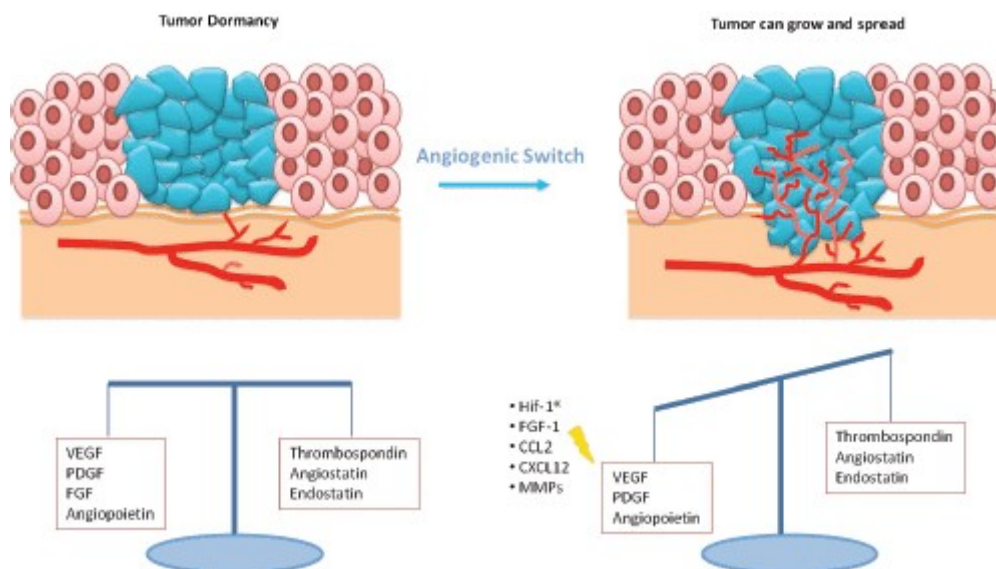


Figura 2: Esquema da angiogênese tumoral. Células tumorais e do microambiente tumoral produzem fatores pró-angiogênicos que alteram o equilíbrio entre fatores anti e pró-angiogênicos, iniciando a angiogênese tumoral (GELAO, et al., 2013).

Dentre as patologias citadas, o câncer é a segunda doença que mais mata no mundo, ficando atrás apenas de doenças cardíacas (CALDERON, et al., 2014). De acordo com a GLOBOCAN, um projeto da Agência Internacional para Pesquisa com Câncer da Organização Mundial da Saúde, em uma pesquisa realizada em 184 países em 2012, a incidência de câncer na população mundial é de 14.1 milhões de novos casos por ano, ocorrendo 8.2 milhões de mortes com 32.6 milhões de pessoas com câncer. A incidência e a mortalidade mundiais referentes a todos os tipos de câncer com exceção do câncer de pele não melanoma são demonstradas nas figuras 3 e 4 respectivamente. Tais números vêm aumentando devido ao envelhecimento da população mundial e à exposição a fatores de risco. Estima-se que em 2030 haverá 12 milhões de mortes por ano decorrentes desta doença.

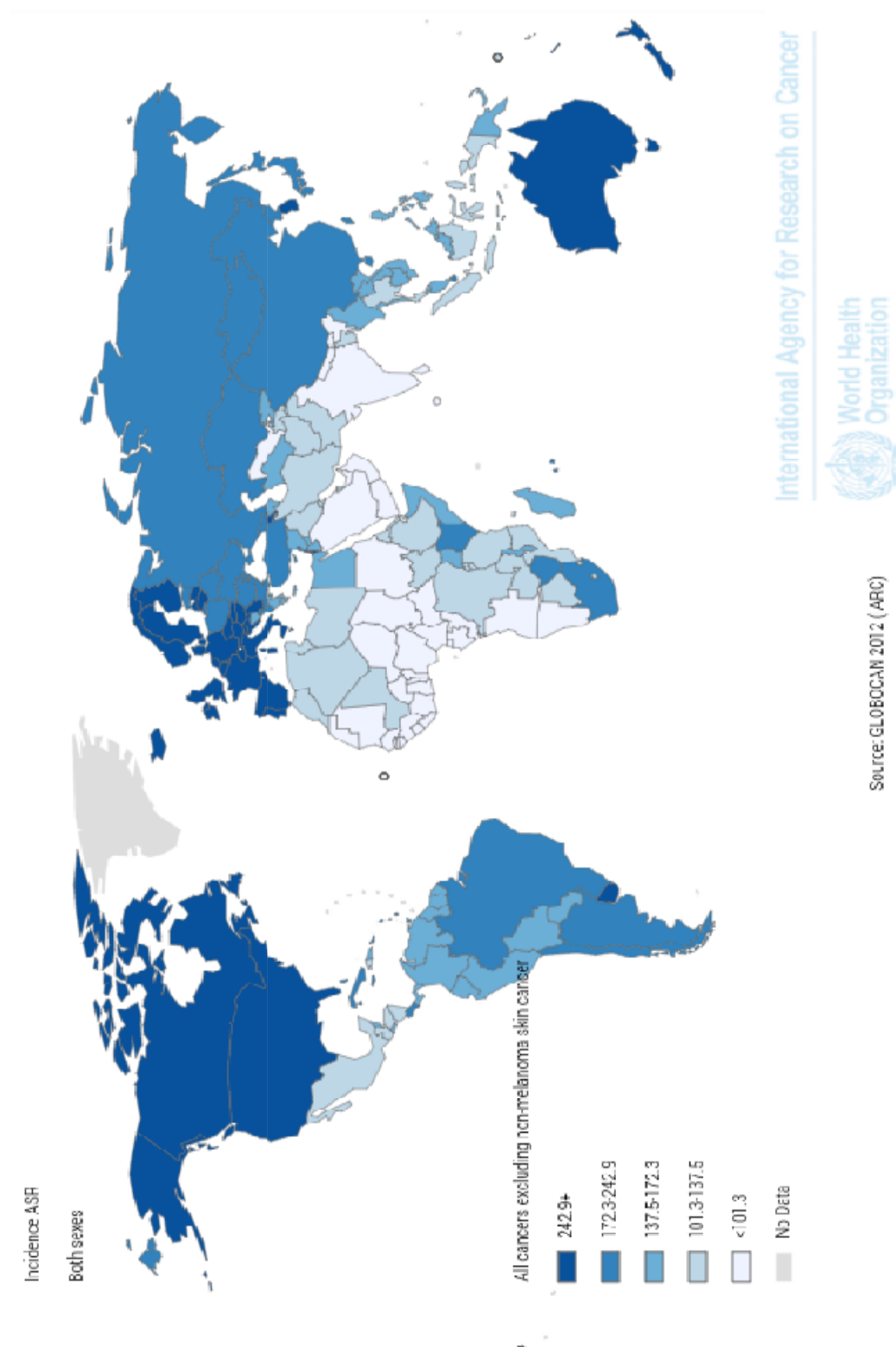


Figura 3: Mapa da incidência mundial de todos os tipos de câncer com exceção do câncer de pele não melanoma (GLOBOCAN, 2012).

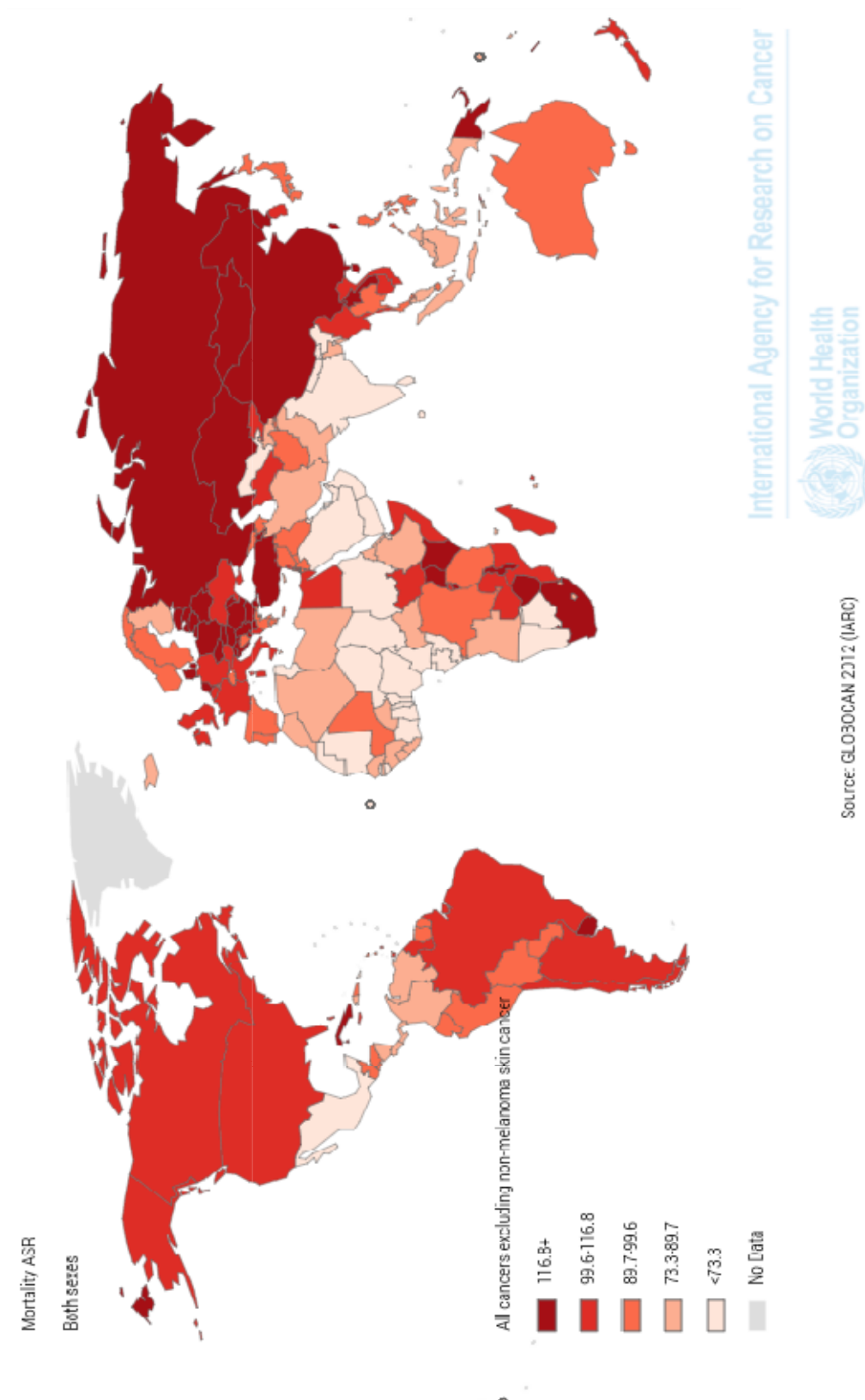


Figura 4: Mapa da mortalidade mundial de todos os tipos de câncer com exceção do câncer de pele não melanoma (GLOBOCAN, 2012).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva estima que nos anos 2016 e 2017 ocorrerão 600 mil novos casos de câncer (Estimativa/2016 – Incidência de Câncer no Brasil, 2015).

A carcinogênese ocorre quando há um desequilíbrio entre os fatores pro e anti-apoptóticos, promovendo a sobrevivência, a proliferação e o crescimento de células que apresentam mutações. No entanto, um tumor é composto não apenas por células tumorais, mas também por vários tipos celulares normais, que dão suporte e auxiliam sua sobrevivência e que constituem o microambiente tumoral (CASEY, et. al., 2015). Hanahan e Weinberg (2011) propuseram os chamados *Hallmarks of cancer*, que são as capacidades adquiridas por um tumor durante o seu desenvolvimento que proporcionam grande complexidade funcional, como, resistência à morte celular, indução da angiogênese, capacidade de invasão e metástase, entre outros (Figura 5).

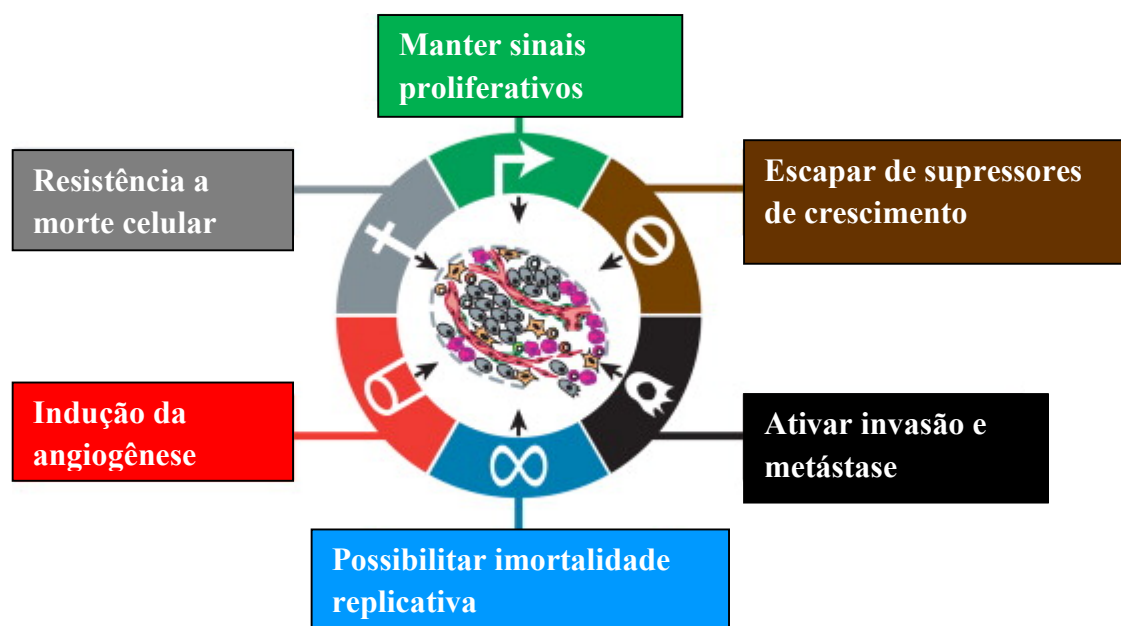


Figura 5: *Hallmarks of câncer* com modificações (Hanahan e Weinberg, 2011).

Em 1971, Folkman desenvolveu a hipótese de que o crescimento tumoral é dependente da angiogênese, e também demonstrou que um tumor só consegue atingir mais de 2mm³ de diâmetro se possuir suplemento sanguíneo (FOLKMAN, 2007), pois a irrigação

sanguínea é responsável pelo fornecimento de nutrientes às células tumorais. Além de permitir a progressão tumoral a angiogênese apresenta séria ameaça metastática, pois junto ao sistema linfático, é o meio de transporte de células tumorais para outros locais do organismo. As células tumorais são capazes de liberar fatores pró-angiogênicos, logo, drogas que têm como alvo a inibição da angiogênese possuem um potencial terapêutico promissor, não almejando diretamente a morte de células tumorais, mas interrompendo a irrigação sanguínea para o local. Componentes anti-angiogênicos são seletivos e apresentam poucos efeitos colaterais, pois a angiogênese em adultos ocorre em poucas condições fisiológicas e as células endoteliais possuem maior estabilidade genética, quando comparadas às células tumorais, por isso medicamentos que têm como alvo células endoteliais são menos propensos ao desenvolvimento de resistência pelo organismo (EICHHORN, 2007).

Os principais tratamentos antineoplásicos utilizados hoje são quimioterapia, radioterapia, e cirurgias para a remoção da massa tumoral (MINISTÉRIO DA SAÚDE INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011). Tais métodos são extremamente invasivos, afetando não só as células tumorais, como também outras células do organismo, causando diversos efeitos colaterais, além de apresentarem alto custo financeiro. Terapias visando alvos específicos encontrados em células tumorais e/ou no microambiente tumoral são menos invasivas e mais eficientes. A pesquisa por moléculas que agem em alvos específicos do tumor, inibindo aspectos dos chamados *Hallmarks of cancer*, e possuem baixa citotoxicidade é o foco das pesquisas contra a doença atualmente, pois, tais medicamentos promoveriam melhor resultado diminuindo os efeitos adversos (SAWYER, 2015; MCDERMOT E SETTLEMAN, 2009).

Diversas pesquisas fornecem evidências de que toxinas isoladas de peçonha de serpente apresentam um grande potencial como agentes antitumorais e podem ser utilizadas como ferramenta para construção de novos agentes quimioterapêuticos (CALDERON, et al.,

2014; VYAS, et al., 2013) . Peçonhas de serpente possuem uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos, como por exemplo, proteínas, carboidratos, enzimas, peptídeos e minerais (CALDERON, et al., 2014). As diferentes proteínas dessas peçonhas possuem diversas aplicações farmacológicas. Da peçonha da *Bothrops pauloensis*, uma espécie de serpente encontrada na América do Sul, já foram isoladas e caracterizadas toxinas de diferentes classes, como fosfolipases A₂ (PLA₂), metaloproteínases, serinoproteases, lectina do tipo C, entre outros (RODRIGUES, 2007; RODRIGUES, 2009; GOMES, 2015). Recentemente nosso grupo de pesquisa apresentou uma revisão sobre as aplicações terapêuticas das diferentes toxinas isoladas da peçonha de *Bothrops pauloensis* (RODRIGUES, et al., 2015) destacadas na Tabela 1.

Tabela 1- Efeitos farmacológicos e terapêuticos de toxinas isoladas de *Bothrops pauloensis*. Adaptada de Rodrigues, et al., 2015.

Classe	Toxina	Efeito Farmacológico	Efeito Terapêutico	Referências
PLA ₂	BnSP-6	Miotoxidade	Bactericida e Leishmanicida	Rodrigues, et al., 1998
PLA ₂	BnSP-7	Miotoxidade Neurotoxidade Inflamação Edematogênica Necrose	Bactericida e Leishmanicida	Rodrigues, et al., 1998
PLA ₂	BnpTX-I e BnpTX-II	Citotoxidade Miotoxidade Neurotoxidade	Bactericida	Rodrigues, et al., 2004
PLA ₂	BpPLA ₂	Miotoxidade Edematogênica	-	Rodrigues, et al., 2007
PLA ₂	BpPLA ₂ TX-I	Miotoxidade Edematogênica	Efeito anti-tumoral e inibição da agregação plaquetária	Ferreira, et al., 2013
Metaloprotease	Botropoidina	Miotoxidade hemorrágica	Inibição da agregação plaquetária	Gomes, et al., 2014

Metaloprotease	BpMP-I	Não hemorrágica	Fibrinogenolítica	Naves de Souza, et al., 2012
Metaloprotease	BpMP-II	Citotoxicidade	Anti- angiogênica e Fibrinogenolítica	Ache, et al., 2014
Serino protease	BpSP-I	-	Desfibrinação	Costa, et al., 2009
Lectina tipo-C	BpLec	-	Bactericida e Anti- parasitária	Castanheira, et al., 2013
LAAO	Bp-LAAO	-	Bactericida, Leishmanicida, Anti-tumoral Inibição da agregação plaquetária	Rodrigues, et al., 2009

As PLA₂s são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação éster na posição sn-2 de glicerofosfolipídeos resultando em ácido araquidônico e lisofosfolipídeo (WAITE, 1987; BURKE e DENNIS, 2009). Elas são classificadas em 15 grupos (SCHALOSKE e DENNIS, 2006), distribuídos em quatro principais classes: PLA₂ secretada (sPLA₂), PLA₂ citosólica (cPLA₂), PLA₂ cálcio independente (iPLA₂) e PLA₂ lipoproteína associada (Lp- PLA₂) (BURKE e DENNIS, 2009). As sPLA₂ endógenas são essenciais na produção de eicosanóides, mediadores lipídicos pró-inflamatórios, e também atuam em vias de sinalização (EGFR, MEPK,PI3K/Akt) que irão aumentar a proliferação celular e a resistência a apoptose e são moderadamente mais expressas em células tumorais. Porém algumas sPLA₂ endógenas atuam na inibição da invasão e da metástase e induzem a morte celular e senescência, através de mecanismos não elucidados (BRGLEZ, LAMBEAU, PETAN, 2014) (Figura 6).

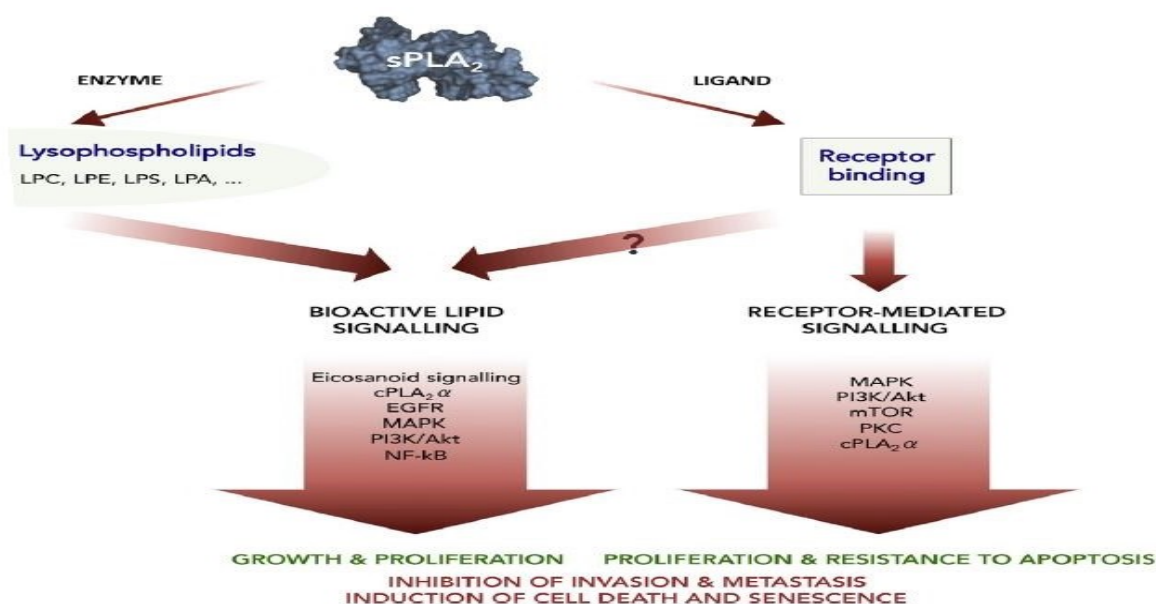


Figura 6: Ação das sPLA₂ endógenas. Ativam vias de sinalização celular através de sua atividade enzimática, levando a produção de sinalizadores eicosanóides ou se ligam em receptores celulares mediando cascatas de sinalizações intracelulares. As sPLA₂ endógenas podem ativar vias que irão levar ao crescimento e proliferação celular e a resistência à apoptose. Ou podem inibir a invasão e metástase e induzir senescência e morte celular, no entanto este mecanismo de ação não foi elucidado (BRGLEZ, et al, 2014).

As PLA₂ secretadas presentes nas peçonhas de serpentes pertencem ao grupo I ou ao grupo II, diferem estruturalmente, principalmente, quanto à posição dos resíduos de cisteína (HEINRIKSON, KRUEGER e KEIM, 1977). As sPLA₂ pertencentes ao grupo II podem ser subdivididas em dois grupos de acordo com o aminoácido presente na posição 49 em: Asp 49, que apresentam um aspartato na posição 49 e possuem o sítio catalítico ativo; e Lys49, que apresentam uma lisina na posição 49 e não possuem o sítio catalítico ativo, pois não conseguem se ligar ao cálcio (BURKE e DENNIS, 2009).

Várias pesquisas têm demonstrado o potencial antitumoral de PLA₂s isoladas de peçonha de serpente (LIANG, et al., 2005; ROBERTO, et al. 2004; CHWETZOFF, et al., 1989; GEBRIM, et al., 2009; CALDERON, 2014, AZEVEDO et al., 2015). A BnSP-6, uma PLA₂ Lys-49 isolada de *Bothrops pauloensis*, mostrou potencial anti-tumoral em MDA-MB-231, uma linhagem de células tumorais da mama (AZEVEDO et al, 2015). Gebrin e

colaboradores (2009), demonstraram o potencial antitumoral da PLA₂ BthTx-I que foi capaz de inibir o desenvolvimento do tumor sólido do Sarcoma 180 em camundongos. Entretanto, poucos trabalhos na literatura demonstram a atividade anti-angiogênica das fosfolipases A₂, isoladas de peçonha de serpentes. Uma fosfolipase A₂ isolada do veneno de *Macrovipera lebetina*, MVL- PLA₂, inibiu a adesão das células HMEC-1 (human microvascular endothelial cell line- 1) ao substrato, a migração e a angiogênese *in vitro* e *in vivo* (BAZZA, et al., 2010).

A BnSP-7 , uma das seis PLA₂s isoladas da peçonha da *B. pauloensis* (RODRIGUES, et al., 1998), é uma Lys49. Ela possui massa molecular de aproximadamente 14kDa, é dimérica e sua estrutura tridimensional é similar a outras PLA₂ Lys49 (Figura 7), possuindo sete pontes dissulfeto e resíduos de aminoácidos básicos e hidrofóbicos, bem como um N-terminal composto por um resíduo de serina e resíduos de Gly30, His48, Asp 99 conservados em sua estrutura (RODRIGUES *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 2000; MAGRO *et al.*, 2003). Seus efeitos farmacológicos descritos até o momento são necrose muscular, inflamações e bloqueio neuromuscular, já seus efeitos terapêuticos estudados foram bactericidas, inibindo o crescimento da bactéria *Escherichia coli* (SOARES et al, 2000), anti-Leishmania, reduzindo a viabilidade e o crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* (NUNES et al, 2013) e anti-Toxoplasma, reduzindo a adesão e proliferação de taquizóides de *Toxoplasma gondii* em concentrações menores do que a necessária para causar citotoxicidade nas células hospedeiras (BORGES, et al., 2016).

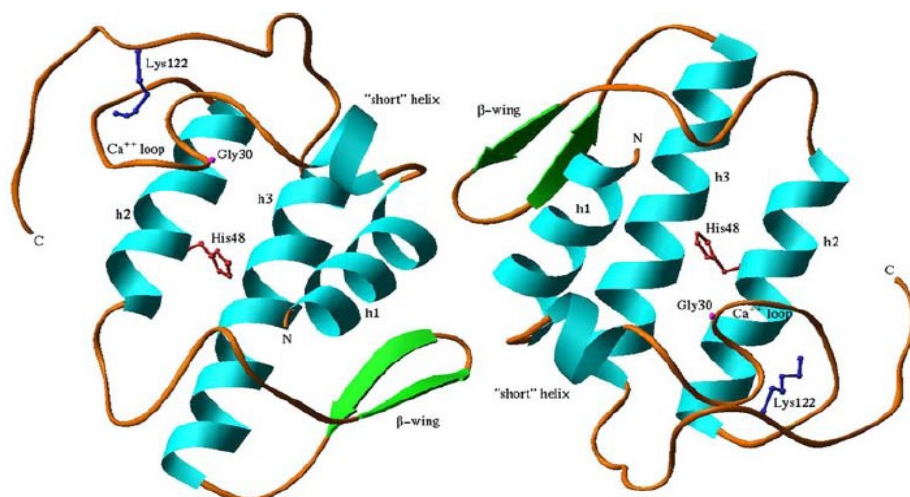


Figura 7: Estrutura BnSP-7, uma PLA₂ Lys49 dimérica. Possui resíduos de aminoácidos básicos e hidrofóbicos, N-terminal composto por um resíduo de serina e resíduos de Gly30, His48, Asp 99 conservados em sua estrutura (MAGRO, et al., 2003).

Diante do potencial bactericida e antiparasitário da PLA₂ BnSP-7 outrora demonstrados, o presente trabalho procurou explorar o seu efeito anti-angiogênico em células HUVECs. São descritas na literatura algumas fosfolipases A₂, isoladas de peçonhas de serpentes e de escorpião, que possuem efeito anti-angiogênico, tendo todas o sítio catalítico ativo, sendo que para a realização dos experimentos estes passaram por um processo de inativação. Visando avaliar os efeitos da PLA₂ BnSP-7, uma Lys49, que naturalmente, não possui seu sítio catalítico ativo, em células HUVECs, avaliamos o efeito citotóxico, a inibição da proliferação celular, inibição da adesão em diferentes componentes da matriz extracelular, inibição da migração e da angiogênese *in vitro*, esperando observar uma ação anti-angiogênica da BnSP-7 em HUVECs.

2. Objetivos

Verificar a atividade anti-angiogênica *in vitro* da PLA₂ BnSP-7 sobre as células endoteliais HUVECs.

2.1 Objetivos específicos

2.1.1 Determinar a citotoxicidade PLA₂ BnSP-7 sobre a linhagem celular HUVEC.

2.1.2 Verificar a inibição da adesão de células HUVECs sobre diferentes substratos induzida pela PLA₂ BnSP-7.

2.1.3 Avaliar a capacidade de migração sobre a linhagem celular HUVEC tratada com a PLA₂ BnSP-7.

2.1.4 Avaliar a inibição da formação de vasos *in vitro* de células HUVECs tratadas com a PLA₂ BnSP-7.

3. Material e Métodos

3.1 Obtenção da peçonha de *Bothrops pauloensis*

O projeto apresenta o Certificado de Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de componente do Patrimônio Genético sob nº 010453/2014-8. A peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* foi obtida a partir de espécimes mantidas no Serpentário CETA- Centro de Extração de Toxinas Animais Ltda- Morungaba, SP. Este serpentário possui comprovante de registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (nº de cadastro: 2087163).

3.2 Obtenção da PLA₂ BnSP7

A PLA₂ BnSP-7 foi purificada de acordo com Rodrigues et al. (1998) com algumas modificações. Aproximadamente 200 mg da peçonha bruta de *B. pauloensis* foram dispersos em 2,0 ml de bicarbonato de amônio 0,05M, pH 8,0, e centrifugados a 480 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aplicado à coluna de CM-Sepharose equilibrada com o tampão de equilíbrio (bicarbonato de amônio 0,05M, pH 8,0). A eluição da proteína foi realizada a 20°C iniciando-se com o tampão de equilíbrio, em seguida foi realizado um gradiente convexo de concentração de bicarbonato de amônio 0,05M a 0,5M, pH 8,0. As frações foram coletadas de 1,0 ml/tubo num fluxo de 6,5 ml/hora, em um coletor Amersham Biosciences RedFrac. A absorvância de cada fração foi lida a 280 nm, em um espectrofotômetro Ultrospec 1000 Pharmacia Biotech. as amostras foram liofilizadas e armazenadas (-20°C).

3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE)

A homogeneidade das amostras contendo a proteína purificada (item 3.2) foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5%, com agentes desnaturantes, conforme a técnica descrita por Laemmli (1970). Foi utilizado um gel de empilhamento a 5% em pH 6,8 contendo 0,125M de Tris-HCL e 0,1% de SDS e um gel de separação a 12,5% em pH 8,8 e 0,1% de SDS, mantendo a relação acrilamida: bis-acrilamida de 30:0,8 (m/m).

3.4 Cultura de células

As células Endoteliais de Cordão Umbilical Humano (HUVECs) adquiridas da ATCC, foram descongeladas rapidamente no banho a 37°C, em seguida foram colocadas em um tubo falcon de 15ml contendo 5ml de meio de cultura RPMI- 1640 (Sigma) suplementado com L-glutamina 2mM, piruvato de sódio 2mM (Sigma), MEM 1mM (Sigma), penicilina/streptomicina 0,1%, Hepes 25mM e SFB 10%. O conteúdo do falcon foi centrifugado a 200 g por 5 minutos a 24°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 5 ml de meio de cultura aquecido, que foi então colocado em uma garrafa de 25cm² e incubado a 37°C em estufa contendo 5% CO₂. Quando as células atingiram 80% de confluência, foram transferidas para uma garrafa de 75cm², por meio do uso de tripsina.

O meio metabolizado presente na garrafa de 25cm² foi descartado e a garrafa lavada rapidamente com 5ml de PBS 1x, em seguida foi adicionado 1ml de tripsina 1x 0,2% EDTA (Sigma) aquecida e a garrafa foi incubada a 37°C por alguns minutos, para que as células se desprendessem. O conteúdo da garrafa foi ressuspensionado em 5ml de PBS com 10% de SFB e transferido para um tubo falcon de 15ml, o qual foi centrifugado a 200 g por 5 minutos a 24°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 1ml de meio RPMI 1640 suplementado e colocado na garrafa de 75cm² com 9 ml do meio de cultura suplementado. A

garrafa foi incubada a 37°C e 5% CO₂.

3.5 Ensaio de viabilidade

O efeito da PLA₂ BnSP7 sobre a viabilidade celular em HUVECs foi avaliado pela oxidação mitocondrial do reagente MTT [do inglês, *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (Sigma) (MTT)], de acordo com Mosmann (1983), com algumas modificações. Células HUVECs (5×10^4 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços na presença de 100 µL de meio RPMI e, no dia seguinte, o meio foi trocado e a PLA₂ BnSP-7 foi adicionada por diluição dupla seriada (100 µg/mL-1,56 µg/mL) e a placa foi incubada. O tratamento das células com meio RPMI foi utilizado como controle. Após 24 horas de incubação em estufa de CO₂, o reagente MTT (20 µL; 5 mg/mL) foi adicionado a cada poço e a placa foi mantida na estufa por mais três horas. Em seguida, os cristais de formazan foram solubilizados com 100 µL de PBS contendo SDS 10% (m/v) e HCl 10 mM. No outro dia, a absorbância foi mensurada a 570 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem, considerando como 100% de crescimento celular a absorbância de células tratadas com meio RPMI. O ensaio foi realizado em três experimentos independentes em triplicata.

3.6 Ensaio de proliferação

O ensaio de proliferação foi realizado de acordo com (LÓPEZ et al, 2010). Brevemente, células HUVECs foram semeadas em três placas de 96 poços na presença de 100 µL de meio RPMI. Na placa número um foram semeadas 1×10^4 células/poço, na placa número dois foram semeadas $0,5 \times 10^4$ células/poço e na placa número três foram semeadas $0,25 \times 10^4$ células/poço. Após 24 horas de incubação o meio da placa número um foi trocado por um novo meio contendo diferentes concentrações de PLA₂ BnSP-7 (40µl/ml, 20µl/ml, 10µl/ml e 5µl/ml) e a

placa foi posteriormente incubada por 72h. A placa número dois foi tratada com a toxina, após 48h de incubação, e novamente incubada por 48h. Já a placa número três, após 72h de incubação foi tratada com a toxina e incubada por 24h. Decorrido os períodos de incubação, foram adicionados 20µl de MTT (5mg/mL) em cada poço em todas as placas, e estas foram incubadas por 2 horas a 37°C na estufa de CO₂, seguido da adição de 100µl de SDS 10% HCL 10mM. Depois de 18 horas de incubação a 37°C 5% CO₂ a absorbância foi mensurada a 570 nm. Tratamento das células com meio RPMI sem a PLA2 BnSP-7 foi utilizado como controle para todos os intervalos de tempo, e o controle negativo foi realizado com meio RPMI sem SFB. O ensaio foi realizado em triplicata, em um experimento independente.

3.7 Inibição da adesão na presença de diferentes componentes da matriz extra celular

O ensaio de inibição da adesão celular foi realizado de acordo com a metodologia previamente descrita por Rigot et al. (1998), com algumas modificações. Células HUVEC (5×10^4 células/poço) foram incubadas com 100 µL da PLA₂ BnSP -7 a 80 µl /ml, 40 µl/ml, 20 µl/ml, 10 µl/ml, e 5 µl/ml (dissolvida em meio RPMI) ou somente meio RPMI (controle) durante 30 minutos a 37°C. Após este período, as células foram então semeadas em placas de 96 poços, as quais foram previamente incubadas com colágeno IV (10 µg/mL), fibronectina (5 µg/mL) ou Matrigel (1 mg/mL; Sigma), e incubados em estufa de CO₂ por duas horas. Um controle sem nenhum substrato incubado às placas também foi realizado. Posteriormente, o meio foi retirado e os poços lavados três vezes com 100 µL de PBS, para a remoção de células não aderidas. Em seguida, meio RPMI (100 µL) e 20 µL de MTT (5 mg/mL) foram acrescentados a cada poço e incubados por três horas em estufa de CO₂. Por fim, 100 µL de PBS contendo SDS 10% (m/v) e HCl 10 mM foram adicionados a cada poço e a leitura da absorbância foi feita a 570 nm após 18h de incubação. Células tratadas apenas com meio

RPMI foram consideradas como controle de 100% de adesão celular. O ensaio foi realizado em triplicata, em três experimentos independentes.

3.8. Inibição da migração celular em *Transwell*

As células HUVECs foram tripsinizadas e ressuspensas em meio RPMI sem SFB. Em seguida, as células (1×10^5 /transwell) foram incubadas a 37°C por 30 minutos com a BnSP-7 nas concentrações de 40µl/ml e 10µl/ml, e plaqueadas na câmara superior do *transwell* que possui uma membrana com poros de 8,0µm (Greiner bio-one). Para o controle positivo foi adicionado meio RPMI suplementado com SFB e para o controle negativo utilizou-se meio RPMI sem SFB. Os *transwell* foram submersos em meio RPMI suplementado com SFB, com exceção do controle negativo que foi submerso em meio RPMI não suplementado com SFB. Após 24 horas de incubação na estufa a 37°C a 5% CO₂, o sobrenadante foi retirado da câmara superior do *transwell* e a membrana foi suavemente limpa com *swab* e corada com kit panótico. A membrana foi então retirada do *transwell* e fixada em lâmina. As fotos foram obtidas pelo programa NIS- Elements F 3.2, com uma câmera fotográfica Nikon acoplada ao microscópio óptico. Em seguida, as células foram contadas. O ensaio foi realizado em triplicata, em três experimentos independentes.

3.9 Inibição da angiogênese *in vitro* induzida por bFGF por ensaio de matrigel

Cerca de 50µl de matrigel (5,25mg/mL) (BD-Biosciences) foram plaqueados em um Câmara de Poliestireno para vasos em cultura de tecidos tratados com vidro em plano inclinado (BD-Falcon) e incubados por 1h a temperatura ambiente. Células HUVECs ($0,5 \times 10^5$) foram tripsinizadas e ressuspensas em meio RPMI tratado com 10ng/L de bFGF.

Posteriormente, as células ($0,5 \times 10^5$) foram incubadas com a BnSP-7 a 40 $\mu\text{l/ml}$ e 10 $\mu\text{l/ml}$, em cada câmara a 37°C por 30 minutos. O controle positivo continha células não tratadas e o volume final em cada câmara foi 300 μl . Após 18 horas de incubação a 37°C e 5% CO_2 , as fotos foram tiradas no programa NIS- Elements F 3.2, com uma câmera fotográfica Nikon acoplada ao microscópio invertido. O ensaio foi realizado como dois experimentos independentes em duplicata.

3.10 Análise estatística

Os resultados foram avaliados com desvio padrão médio. A significância dos resultados comparados aos controles, foi calculada pelo método ANOVA com teste de comparação múltipla de Bonferroni no programa GraphPad Prism. Houve significância estatística quando o valor foi $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Obtenção da PLA₂ BnSP-7

O fracionamento de 135,8mg (dosados) da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* em CM-Sephrose produziu seis frações (CM1, CM2, CM3,CM4 e CM5a, CM5b) (Figura 8). A fração CM5b continha a fosfolipase A₂ BnSP-7 correspondendo a 18,4% da peçonha bruta.

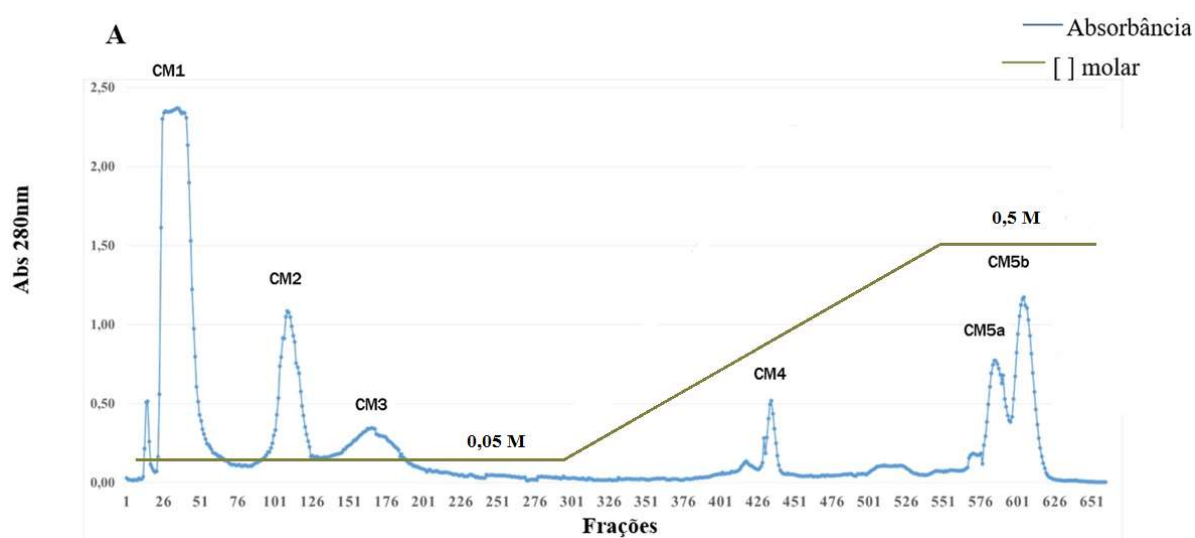


Figura 8: Fracionamento de 135,8mg da peçonha de *B. pauloensis* em coluna 1,4x26cm contendo resina CM-Sephrose equilibrada com o tampão de equilíbrio bicarbonato de amônio 0,05M, pH 8,0, com fluxo de 6,5ml/hora a temperatura ambiente. A eluição foi realizada com o tampão de equilíbrio, em seguida foi realizado um gradiente convexo de concentração de bicarbonato de amônio 0,05M a 0,5M, pH 8,0.

4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de agente desnaturante (SDS) foi realizada para certificar a homogeneidade da amostra. Como pode ser observado na figura 9, a fração CM5b obtida da cromatografia em CM-Sepharose, apresentou uma única banda de aproximadamente 14KDa, não demonstrando a presença de contaminantes. A fração CM5b foi denominada de BnSP-7.

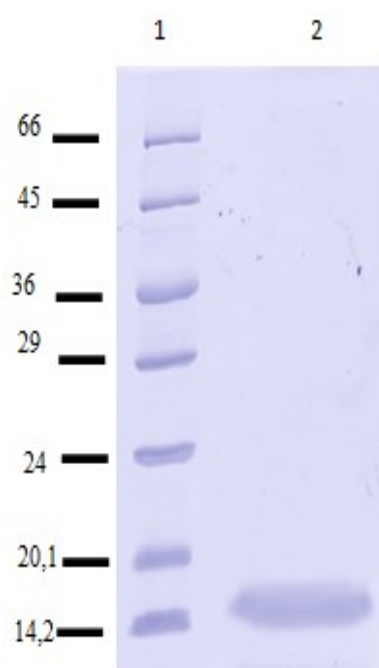


Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo padrão de peso molecular e a fração CM5b obtida da cromatografia em CM-Sepharose. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 a 2,5% e em seguida descorado em ácido acético 10%, etanol 30% e água deionizada. 1- Padrão de massa molecular (KDa). 2- PLA₂ BnSP-7. Padrão de peso molecular: Albumina Bovina 66 KDa; Ovoalbumina 45 KDa; Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 36 KDa; Anidrase carbônica 29 KDa; Tripsinogênio 24 KDa; Inibidor de tripsina 20,1 KDa; α -lactoalbumina; 14,2 KDa.

4.3 Ensaio de Viabilidade por MTT

Para avaliar o efeito anti-angiogênico da PLA₂ Lys49 BnSP-7 em HUVECs, primeiramente realizamos o ensaio de viabilidade por MTT para verificar sua citotoxicidade nestas células, e selecionar doses abaixo das concentrações tóxicas para os ensaios seguintes. Para isso as HUVECs foram tratadas com a toxina em diferentes concentrações (100µg/ml, 50µg/ml, 25µg/ml, 12,5µg/ml, 6,25µg/ml, 3,12µg/ml e 1,56µg/ml). A PLA₂ BnSP-7 não alterou significativamente a viabilidade das células em nenhuma das concentrações observadas quando comparadas ao controle (Figura 10).

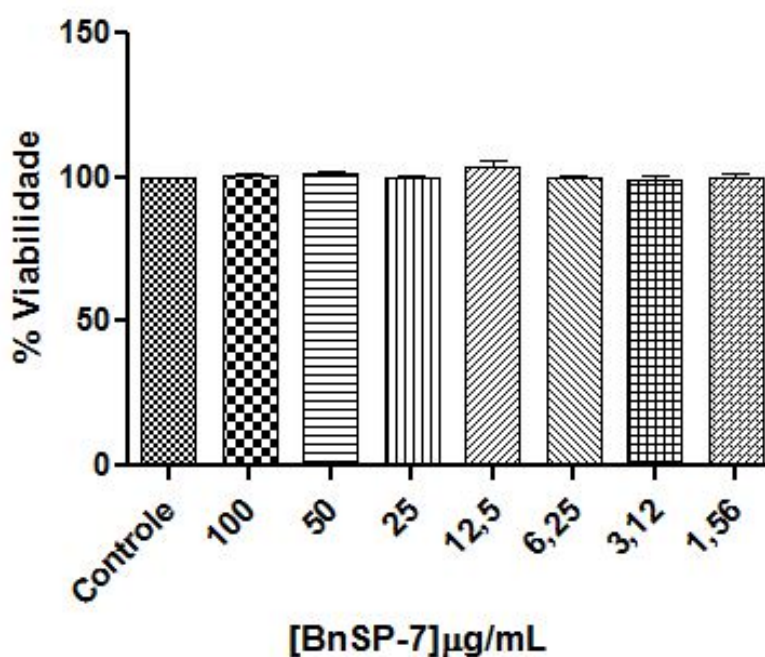


Figura 10: Ensaio de viabilidade por MTT.. As HUVECs foram tratadas com a BnSP-7: 100µg/ml, 50µg/ml, 25µg/ml, 12,5µg/ml, 6,25µg/ml, 3,12µg/ml e 1,56µg/ml. Após 24h de incubação foi adicionado o reagente MTT (5mg/mL) e decorridas três horas foi acrescentado SDS 10% HCl 10mM. No dia seguinte a absorbância foi mensurada a 570nm. Não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$ ANOVA) comparada ao controle. O controle positivo para viabilidade foram células não tratadas.

4.4 Inibição da proliferação celular

O ensaio de proliferação foi realizado em três tempos 24, 48 e 72 horas, com células tratadas com quatro concentrações da BnSP-7, 40µg/ml, 20µg/ml, 10µg/ml e 5µg/ml. Observamos que a inibição da proliferação foi proporcional à dose e ao tempo, isto é, quanto maior o tempo de tratamento e a dose da toxina, menor era a proliferação das HUVECs quando comparada ao controle (Figura 11). Deste modo, as células tratadas com BnSP-7 a 40µg/ml por 72 horas apresentaram baixa proliferação, comparadas ao controle.

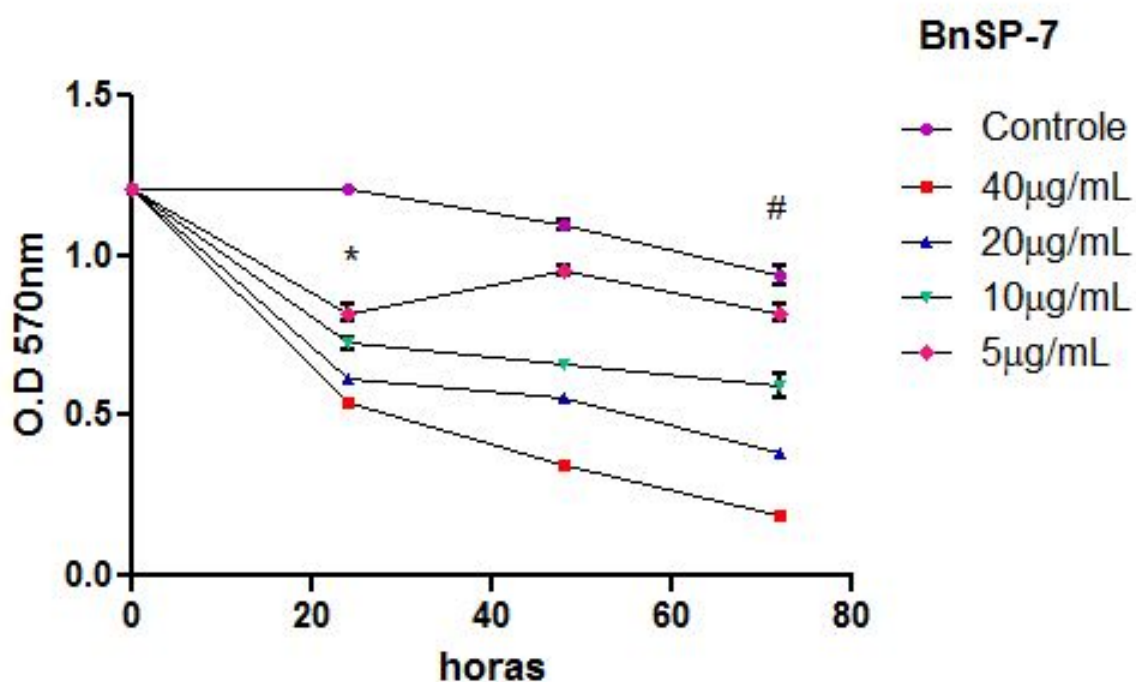


Figura 11: Ensaio de proliferação em HUVECs. As células foram tratadas com 4 diferentes concentrações de BnSP-7 por 24, 48 e 72 horas e analisadas pelo método de MTT. O controle continha células não tratadas. * Não houve diferença estatística significativa entre as concentrações 40µg/ml e 20µg/ml nas células tratadas por 24h ($P > 0,05$). # Não houve diferença estatística significativa entre o controle e o tratamento na concentração de 5µg/ml nas células tratadas por 72h ($P > 0,05$). Houve diferença estatística significativa entre os demais tratamentos comparados ao controle ($P < 0,05$ ANOVA).

4.5 Inibição da adesão de HUVEC em diferentes componentes da matriz extra celular

A PLA₂ BnSP-7 foi capaz de inibir a adesão de HUVECs sobre os três diferentes substratos: colágeno IV, fibronectina e matrigel (Figura 12), mostrando maior inibição da adesão sobre o colágeno IV e o matrigel quando comparados ao substrato fibronectina e na ausência de substrato. Nas concentrações de 5µg/ml ou 80µg/ml a BnSP7 foi capaz de inibir aproximadamente 40% e 80 % a adesão ao colágeno, respectivamente (Figura 12).

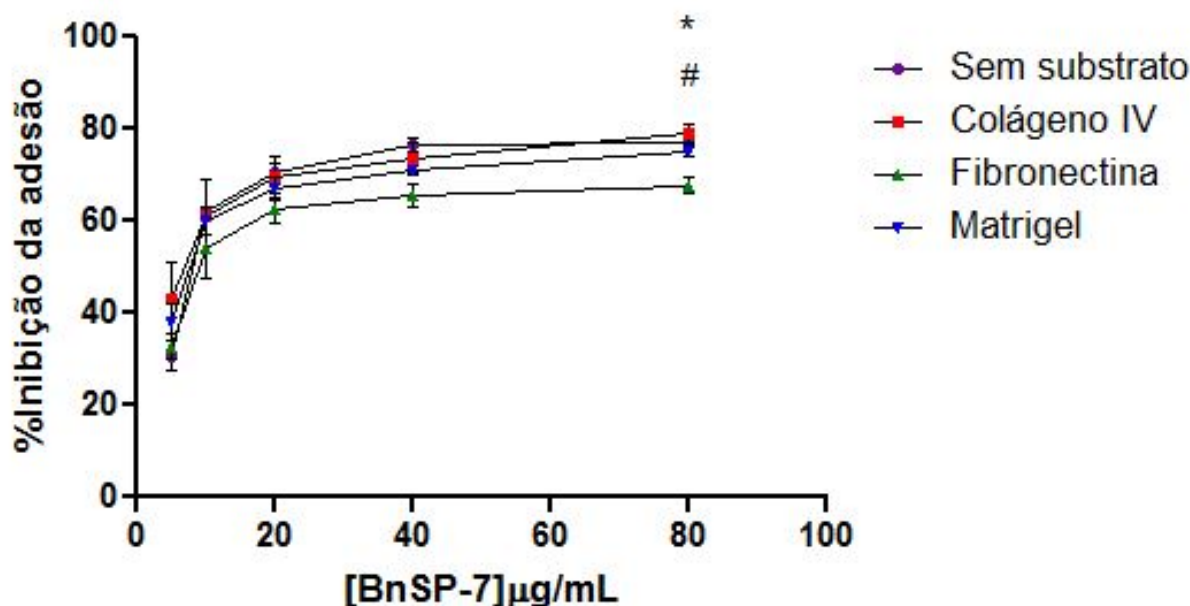


Figura 12: Ensaio de inibição da adesão celular na presença ou ausência de diferentes substratos (colágeno IV, fibronectina e matrigel). Células HUVECs (5×10^4 células/poço) foram tratadas com diferentes concentrações de BnSP-7 (80µg/ml, 40µg/ml, 20µg/ml, 10µg/ml e 5µg/ml) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, as células foram plaqueadas e adesão celular foi determinada pelo método do reagente MTT, sendo o tratamento com meio RPMI considerado como 100% de adesão. * Diferença estatística significativa entre colágeno IV e e fibronectina ($P < 0,05$ ANOVA). # Diferença estatística significativa entre fibronectina e matrigel ($P < 0,05$).

4.6 Inibição da migração de HUVEC em *Transwell*

As células foram tratadas com BnSP-7 a 40 μ g/ml e 10 μ g/ml, sendo que ambas as concentrações inibiram significativamente a migração das HUVECs no *Transwell*, quando comparadas ao controle positivo (presença de SFB) e ao controle negativo (ausência de SFB) (Figura 13A). Como pode ser observado na figura 13B, a presença do SFB induziu uma grande migração celular evidenciada por uma intensa coloração, a qual indica um grande número de células HUVECs presentes no *Transwell*. Inversamente, houve uma significativa redução da intensidade de coloração do *Transwell* na ausência do SFB (controle negativo) (Figura 13C), e com o prévio tratamento das HUVECs com a BnSP-7 (Figuras 13D e 13E).

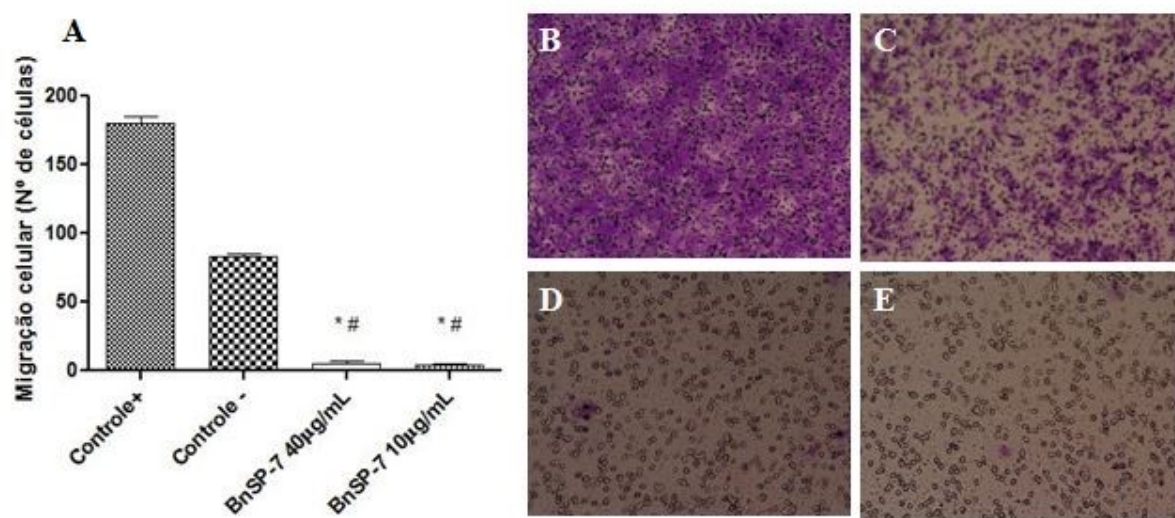


Figura 13: Ensaio de Migração em *Transwell*. Para o controle positivo foram usadas células em meio com soro fetal bovino (SFB). Para o controle negativo foram usadas células em meio sem SFB. As células foram tratadas com duas concentrações de BnSP-7, 40 μ g/mL e 10 μ g/mL. Após 24h as células foram coradas kit panótico, contadas e fotografadas na objetiva de 20x. A: Medida quantitativa da migração celular. * Diferença estatística significativa quando comparado ao controle positivo ($P < 0,05$), # Diferença estatística significativa quando comparado ao controle negativo ($P < 0,05$). B: Controle positivo; C: Controle negativo; D: BnSP-7 10 μ g/mL; E: BnSP-7 40 μ g/mL.

4.7 Inibição da angiogênese *in vitro* induzida por bFGF em ensaio de matrigel

No ensaio de inibição da angiogênese *in vitro* as HUVECs foram tratadas com duas concentrações de BnSP-7, 10µg/ml e 40µg/ml e plaqueadas em matrigel. O controle, células não tratadas, induziu a angiogênese *in vitro*, formando vasos (Figura 14A). Já as células tratadas com a toxina, em ambas as concentrações, não formaram vasos (Figura 14B e 14C), demonstrando a capacidade da PLA₂ Lys49 BnSP-7, que não possui o sítio catalítico ativo, de inibir a angiogênese *in vitro*, sendo esta a primeira fosfolipase A₂ Lys49 a demonstrar tal capacidade. As imagens foram analisadas por microscopia de contraste de fase sob ampliação de 20 x.

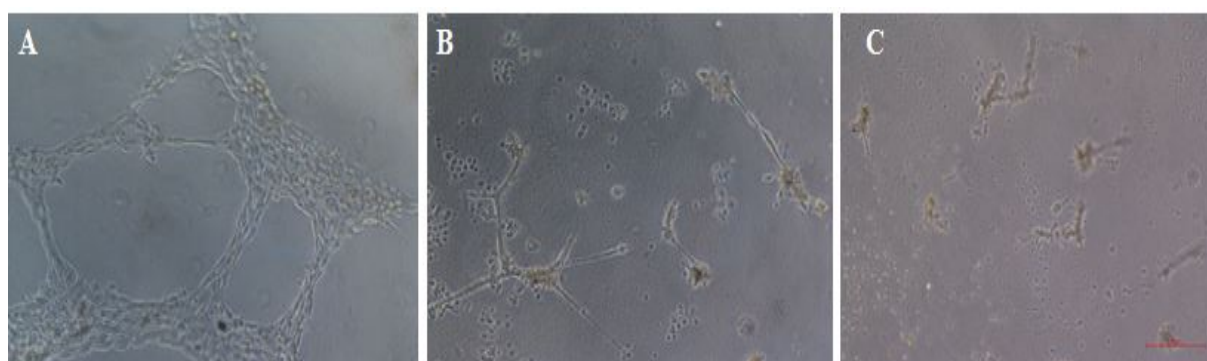


Figura 14: Ensaio de inibição da angiogênese *in vitro* com matrigel. A: Controle positivo, células não tratadas. B: Células tratadas com BnSP-7 10µg/mL. C: Células tratadas com BnSP-7 40µg/mL. As células foram fotografadas após 18h de tratamento na objetiva de 20x.

5.0 Discussão

Desde 1971, quando Folkman desenvolveu a hipótese de que o crescimento tumoral é dependente da angiogênese, várias pesquisas foram realizadas, confirmando sua teoria e resultando em demais pesquisas a procura por moléculas capazes de inibir a angiogênese e serem utilizadas como possíveis terapias para o câncer (FOLKMAN, 2007). Peçonhas de serpentes possuem grande variedade de compostos biológicos, dentre eles, vários componentes apresentam atividade anti-angiogênica, sendo as desintegrinas as mais estudadas (MCLANE et al, 2008). Poucos estudos publicados, até o momento, descrevem a ação de PLA₂s isoladas de peçonhas na angiogênese (BAZZA, et al., 2010 e KESSENTINI-ZOUARI, et al., 2010, JRIDI, et al., 2015).

As PLA₂s Lys-49 isoladas de peçonha de serpentes não apresentam atividade catalítica, portanto seu efeito sobre células pode ser devido ao rompimento da membrana plasmática sem que ocorra a hidrólise de fosfolipídeos de membrana. De acordo com Lomonte et al. (2003), uma característica estrutural comum de PLA₂s que não possuem o sítio catalítico ativo, é que elas possuem uma face catiônica, na região C-terminal, que pode interagir com os lipídios carregados negativamente na membrana plasmática. Tal interação é provavelmente seguida pela penetração e desorganização da membrana (LOMONTE et al, 2003).

A PLA₂ BnSP-7 não possui atividade catalítica, portanto não é capaz de produzir ácido araquidônico, como as PLA₂ cataliticamente ativas, o qual será utilizado como substrato na via das cicloxigenases para a produção de prostaglandinas, que estimula a expressão de fatores de crescimento pró-angiogênicos,. No entanto, já foi demonstrado a indução na produção de mediadores inflamatórios lipídicos (prostaglandinas e leucotrienos) induzidos por PLA₂s Lys-49 (CHACUR, et al., 2004; MOREIRA, et al., 2003). Moreira et al. (2013) demonstraram que macrófagos tratados com MT-II, uma PLA₂ Lys49 isolada da peçonha de

Bothrops asper, induziu a produção de prostaglandina e a expressão de COX-2, também foi capaz de fosforilar várias quinases, p38, PI3K, PKC e ERK, ativando várias vias de sinalização que participam da via de produção das prostaglandinas, um mediador pró-inflamatório (MOREIRA, et al., 2003). A capacidade inflamatória de PLA₂ Lys49 de peçonhas ofídicas é atribuída à região C-terminal composta por duas regiões conservadas de resíduos de aminoácidos básicos e hidrofóbicos que podem interagir com fosfolipídios de membrana carregados negativamente e desta forma desestabilizar a membrana celular (DENNIS, 1994; ALOULOU, et al., 2012; RODRIGUES, et al., 2015).

Contudo, a ação da BnSP-7 sobre as células HUVECs pode ser mediada pela interação desta com integrinas e/ou outras proteínas de membranas que uma vez ligadas a BnSP-7 podem desencadear a ativação ou inibição de cascatas de sinalização intracelular modulando vias que levam a diversos efeitos como por exemplo a apoptose.

A PLA₂ Lys49 BnSP-7, cujas ações anti-angiogênicas foram primeiramente descritas no presente estudo, foi isolada da peçonha de *B. pauloensis* em coluna cromatográfica de troca iônica (CM-Sepharose) seguindo as metodologias previamente descritas por Rodrigues et al., (1998) e Soares et al. (2000). Após este processo, a homogeneidade da PLA₂ BnSP-7 foi confirmada por SDS-PAGE.

As PLA₂s Lys-49 de peçonhas botrópicas são proteínas homodiméricas, enzimaticamente inativas possuindo caráter básico e massa molecular de aproximadamente 14kDa (DA SILVA GIOTTO et al., 1998; ARNI et al., 1999; SCHALOSKE e DENNIS, 2006; FERNANDES et al., 2010). Essas proteínas já foram isoladas de diferentes peçonhas (DÍAZ, et al., 1995; RODRIGUES, et al., 1998; FULY, et al. 2002) e suas propriedades farmacológicas bem como terapêuticas vêm sendo amplamente desvendadas (SOARES et al, 2000; RODRIGUES, et al., 2004; Rodrigues, et al., 2007; YAN, et al., 2007; FERREIRA, et.

al., 2013; NUNES et al, 2013; AZEVEDO, et al., 2016).

Nesse contexto, a atividade anti-angiogênica da PLA₂ BnSP-7 sobre células HUVECs foi avaliada. Inicialmente, observamos que a BnSP-7 nas concentrações de 1,56 µg/ml a 100 µg/mL não alterou a viabilidade das HUVECs, assim como foi demonstrado pela MVL-PLA₂ isolada da peçonha de *Macrovipera lebetina*, a qual não alterou a viabilidade de células endoteliais macrovasculares humana 1 (HMEC1) (BAZZA, et al., 2010) e CC-PLA₂-1 e CC-PLA₂-2 isoladas de *Cerastes cerastes* que também não diminuíram a viabilidade de células endoteliais microvasculares do cérebro humano (HBMEC) (KESSENTINI-ZOUARI, et al., 2010). Por outro lado, a proliferação celular das HUVECs foi reduzida quando tratadas com a BnSP-7, sendo este efeito não observado pelas fosfolipases MVL-PLA₂, CC-PLA₂-1 e CC-PLA₂-2 (BAZZA, et al., 2010 e KESSENTINI-ZOUARI, et al., 2010), demonstrando o maior potencial da BnSP-7 como um modelo farmacológico, pois a capacidade de diminuição da proliferação celular é importante para o controle eficiente da angiogênese. As três fosfolipases citadas possuem o sítio catalítico ativo, porém, para os experimentos elas passaram por um processo de inativação. A BnSP-7 já é uma fosfolipase cataliticamente inativa, não precisando ser quimicamente modificada para a realização dos experimentos.

A BnSP-7 promoveu, em diferentes concentrações, a inibição da adesão das células HUVECs nos diferentes substratos, fibronectina, colágeno IV e matrigel, bem como foi capaz de inibir a migração e a angiogênese *in vitro*. Estes efeitos inibitórios de PLA₂s sobre mecanismos de adesão, migração e angiogênese foram pouco explorados no meio científico. Estudos também realizados com as PLA₂s, CC-PLA₂-1, CC-PLA₂-2 e MVL-PLA₂ anteriormente descritas e a PLA₂ isolada da peçonha do escorpião *Hemiscorpius lepturus*, denominada Hemilipin, demonstraram que estas proteínas foram capazes de inibir a adesão de células endoteliais ao fibrinogênio e fibronectina através de interações com as integrinas α5β1 e αv, respectivamente (BAZZA, et al., 2010; KESSENTINI-ZOUARI, et al., 2010, JRIDI, et

al., 2015). Estes substratos são componentes da matriz extracelular e se ligam a diferentes integrinas da membrana plasmática. As integrinas são moléculas de adesão da membrana celular, responsáveis pela adesão das células à matriz extracelular. Esta interação é responsável por sinalizações celulares que controlam a adesão, migração, proliferação, diferenciação, apoptose e a angiogênese (AKALU et al, 2005 e ALGHISI et al, 2006). A interação de PLA₂s com integrinas pode impedir que essas se liguem aos componentes da matriz extracelular impedindo processos de adesão e migração celular, bem como a formação de novos vasos sanguíneos. Estudos de citometria de fluxo em andamento em nosso laboratório demonstraram que a BnSP-7 foi capaz de reconhecer as integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 5$ (dados não mostrados). $\alpha 2\beta 1$, se liga ao colágeno, estudos verificaram que quando esta interação não ocorre a proliferação e a migração de células endoteliais são reduzidas devido a falta de sinalização que ocorre através deste receptor (GHATAK, et al. 2016). $\alpha v\beta 3$, se liga a fibronectina regulando as vias p38 e MAPK essenciais para a angiogênese (PETITCLERK, et al., 2000; CONTOIS, et al., 2014). Já $\alpha 5$, se liga a fibronectina e possui grande importância na formação do tubo (LIU, et al., 2009). No entanto, novos experimentos devem ser conduzidos para confirmar se de fato a PLA₂ BnSP-7 interfere na adesão e angiogênese das células HUVECs por meio de tais integrinas.

Azevedo *et al.* (2016) demonstraram que a PLA₂ Lys49 BnSP-6, uma fosfolipase homóloga da BnSP-7, também isolada da peçonha de *B. pauloensis*, causou significativa citotoxicidade sobre células tumorais de câncer de mama (MDA-MB-231), quando comparada com uma linhagem de mama não tumorigênica (MCF10A), além de induzir apoptose, diminuir a adesão, a migração dessas células e diminuir a expressão de genes relacionados a estes processos (AZEVEDO et al., 2016). Recentemente, Almeida e colaboradores (2016) verificaram que a BnSP-6 também é capaz de induzir genotoxicidade em células (MDA-MB-231), alterar o ciclo celular por promover a diminuição da proliferação

celular acumulando as células na fase G0-G1. Além disso, a BnSP-6 diminuiu a expressão de genes relacionados ao avanço das células pelo ciclo celular. Tais resultados demonstram a importância de estudo sobre o efeito terapêutico de PLA₂ Lys49 isoladas de peçonhas de serpentes.

Nossas perspectivas são verificar com quais são os alvos moleculares da BnSP-7 nas HUVECs e descrever um provável mecanismo de ação.

6.0 Conclusão

Nossos resultados demonstraram que a ação anti-angiogênica da PLA₂ BnSP-7 não ocorre devido a citotoxicidade desta toxina, pois mesmo em altas concentrações não observamos alteração na viabilidade celular das HUVECs. A proliferação, adesão e migração celular são essenciais para o processo de angiogênese, e sem a formação de vasos não há desenvolvimento tumoral e a chance de metástase é consideravelmente reduzida. Desta forma, compostos anti-angiogênicos capazes de inibir estas ações, sem afetar a viabilidade celular, apresentam grande potencial para o tratamento tumoral.

A capacidade da BnSP-7 de inibir a adesão das HUVECs nos três substratos testados, diminuir a proliferação das células, inibir a migração e a angiogênese *in vitro*, sem demonstrar citotoxicidade para as células, faz com que esta enzima possua um potencial modelo farmacológico que deve ser explorado.

7.0 Referências Bibliográficas

ACHE, D. C., et al. Biochemical properties of a new PI SVMP from *Bothrops pauloensis*: Inhibition of cell adhesion and angiogenesis. **Int. J. Biol. Macromol**, vol. 72, p. 445-453, 2014.

AKALU, A., et al. Targeting integrins for the control of Tumour angiogenesis. **Expert Opin Investig Drugs**, v.14, p. 1475–1486, 2005.

ALGHISI, G.C., et al. Vascular integrins in tumor angiogenesis: mediators and therapeutic targets. **Endothelium**.v.13, p. 113–135, 2006.

ALMEIDA, M. Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade da fosfolipase A2 BnSP-6, isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* sobre células de câncer de mama MDA-MB- 231: Uma análise sobre o ciclo celular. 29 de Julho de 2016. 83 páginas. Dissertação – Universidade Federal de Uberlândia.

ALOULOU, A. et al. Phospholipases: An Overview. **Lipases and Phospholipases**, v. 861, p. 63-85, 2012.

ARNI, R.K., et al. Crystal structure of myotoxin II, a monomeric Lys49-phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of *Cerrophidion (Bothrops) godmani*, **Arch. Biochem. Biophys.** v. 366, p.177–182, 1999.

AZEVEDO, F. V., et al. Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA₂ homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **Int J Biol Macromol**. v. 86, p. 671–677. 2016.

BAZZA, 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**, vol. 5, p.1-10,2010.

BANKS, R. E. et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. **Br. J. Cancer** , v.77, p.956–964, 1998.

BORGES, I.P. et al. Anti-parasitic effect on *Toxoplasma gondii* induced by BnSP-7, a Lys49-phospholipase A2 homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **Toxicon**, 2016

BURKE, J. E., et al.. Phospholipase A2 biochemistry. **Cardiovasc. Drugs Ther.**, vol. 23, p. 49-59, 2009.

BURKE, J.E. et al. Phospholipase A2 structure/ function, mechanism, and signaling. **J Lipid Res**, vol. 50, p. S237–242, 2009.

BRGLEZ, V. et al. Secreted phospholipases A2 in cancer: Diverse mechanisms of action. **Biochimie**, v.107, p. 114-123, 2014.

CALDERON, L. A. et al. Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy. **BioMed Research International**. p.1-19, 2014.

CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nat. Med.**, vol.6, p. 389–395, 2000.

CASEY, S.C. et al. The effect of environmental chemicals on the tumor microenvironment. **Carcinogenesis**, vol. 36, p.160-183, 2015.

CASTANHEIRA, L. E. et al. Biochemical and functional characterization of a C-type lectin (BpLec) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Int. J. Biol. Macromol**, vol. 54, p.57-64, 2013.

CHACUR, M. et al. Snake venom phospholipase A2s (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. **Pain**, v. 108, p.180–191, 2004.

CHWETZOFF, S. et al. Nigexine, a phospholipase A2 from cobra venom with cytotoxic properties not related to esterase activity. Purification, amino acid sequence, and biological properties. **The Journal of Biological Chemistry**. vol. 264, p.13289-97, 1989.

CLAPP, C. et al. Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis. **Physiological Reviews**, vol. 89, p. 1177-1215, 2009.

CONTOIS, L.W. et al. Inhibition of tumor-associated $\alpha v \beta 3$ integrin regulates the angiogenic switch by enhancing expression of IGFBP-4 leading to reduced melanoma growth and angiogenesis in vivo. **Angiogenesis**, v. 18, p. 31–46, 2015.

COSTA, F. L., et al. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, vol. 54, p. 725-735, 2009.

DA SILVA GIOTTO, M.T. et al. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49 phospholipase A₂ homologue. **Prot. Struct. Funct. Genet**, v. 30, p. 442–454, 1998.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **The Journal of Biological Chemist**, v. 269, p. 13057-13060, 1994.

DIAZ, C. et al. Purification and characterization of myotoxin IV, a phospholipase A₂ variant, from *Bothrops asper* snake venom. **Nat.Toxins**, v. 3, p. 26–31, 1995.

DHANANJAYA, B.L. et al. Snake Venom Derived Molecules in Tumor Angiogenesis and its Application in Cancer Therapy; An Overview. Current **Topics in Medical Chemistry**, vol. 15, p. 649-657, 2015.

EBOS, J.M. et al. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. **Cancer Cell**, v. 15, p.232–239, 2009.

EDMAN P., BEGG G., **European journal of biochemistry** / FEBS, vol.1, p. 80-91, 1967.

FERNANDES, C.A.H. et al. Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca²⁺-binding loop region for the catalytically inactive Lys49–PLA₂s, **J. Struct. Biol.** v.171, p.31–43, 2010.

FERREIRA, F. B., et al. Molecular cloning and pharmacological properties of an acidic PLA₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxins**, vol. 5, p. 2403-2419, 2013.

FOLKMAN, J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. **N Engl J Med**, vol. 285, p. 1182-1186, 1971.

FOLKMAN, J. Is angiogenesis an organizing principle in biology and medicine?. **Journal of Pediatric Surgery**, vol. 42, p.1-11, 2007.

FULY, A.L. et al. Purification and characterization of a phospholipase A2 isoenzyme isolated from Lachesis muta snake venom. **Biochem Pharmacol.**, v.63, p.1589-97, 2002

GALEO, L. et al. Tumour dormancy and clinical implications in breast cancer. **ecancer**. vol. 7, 2013.

GANESAN, K. et al. Inhibition of gastric cancer invasion and metastasis by PLA2G2A, a novel betacatenin/TCF target gene. **Cancer Res**, v. 68, p.4277-4286, 2008.

GEBRIM, L.C. Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. **Biologicals**, vol. 37, p.222–229, 2009.

GLOBOCAN, Map. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx#>> Acesso em 26 de outubro de 2016.

GHATAK, S. et al. Role of Integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ in Wound and Tumor Angiogenesis in Mice. **The American Journal of Pathology**, p. 1-17, 2016.

GOMES, M. S., et al. Biochemical and functional characterization of Bothropoidin: the first haemorrhagic metalloproteinase from Bothrops pauloensis snake venom. **Jornal of Biochemistry**, 2014.

GRUNEWALD, M. et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. **Cell**, v. 124, p. 175–189, 2006.

HANAHAN, D. et al. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, vol. 86, p. 353–364, 1996.

HANAHAN, D. et al. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, p.646-674, 2011.

HEINRIKSON, R.L. et al. Amino acid sequence of phospholipase A₂-alpha from the venom of *Crotalus adamanteus*. A new classification of phospholipases A₂ based upon structural determinants. **J Biol Chem**, vol. 252, p. 4913–4921, 1977.

HUGHES, C. C. Endothelial-stromal interactions in angiogenesis. **Curr. Opin. Hematol**, v. 15, p. 204–209, 2008.

INCA, Estimativa/2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>> Acesso em 26 de outubro de 2016.

JRIDI, I. et al. Hemilipin, a novel Hemiscorpius lepturus venom heterodimeric phospholipase A₂, which inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. **Toxicon**, vol. 105, p. 34-44, 2015.

KESSENTINI-ZOUARI, R. et al. CC-PLA₂-1 and CC-PLA₂-2, two Cerastes cerastes venom-derived phospholipases A₂, inhibit angiogenesis both in vitro and in vivo. **Laboratory Investigation**, vol. 90, p. 510–519, 2010.

LEE, P. et al. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. **Surv Ophthalmol**, vol. 43, p. 245-269, 1998.

LIANG, Y. et al., Correlation of antitumor effect of recombinant sea snake basic phospholipase A₂ to its enzymatic activity. **Ai Zheng**, vol. 24, p. 1474–1478, 2005.

LIU, Z. et al. VEGF and inhibitors of TGFβ type-I receptor kinase synergistically promote blood-vessel formation by inducing α5-integrin expression. **Journal of Cell Science**, v. 122, p. 3294-3302, 2009.

LOMONTE, B. et al. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, vol. 42, p.885–901, 2003.

LÓPEZ, N.C. et al. Antiangiogenic and Antitumor Effects of *Trypanosoma cruzi* Calreticulin. **PLoS Negl Trop Dis**, vol. 4, e730, 2010.

MAGRO, A. J. et al. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A2: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 311, p. 713–720, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE Instituto Nacional de Câncer (INCA). ABC do Câncer- Abordagens básica para o controle do cancer. p. 66-69, Rio de Janeiro, 2011.

MCDERMOTT, U. et al. Personalized Cancer Therapy With Selective Kinase Inhibitors: An Emerging Paradigm in Medical Oncology. **Journal of Clinical Oncology**, vol.27, p.5650-5659, 2009.

MCLANE, M.A. et al. Disintegrins in health and disease. **Front Biosci**, v.13, p. 6617–6637, 2008.

MONTECUCCO, C. et al. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cell Mol Life Sci**, vol. 65, p.2897–2912, 2008.

MOREIRA, V. et al. A catalytically-inactive snake venom Lys49 phospholipase A2 homolog induces expression of cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins through selected signalling pathways in macrophages. **European Journal of Pharmacology**, v. 708, p.68–79, 2013.

NAVES DE SOUZA, D. L., et al. Biochemical and enzymatic characterization of BpMP-I, a fibrinogenolytic metalloproteinase isolated from *Bothropoides pauloensis* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, vol. 161, p. 102-109, 2012.

NUNES, D. C. et al. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. **Parasitology**, vol. 140, p. 844-854, 2013.

PAPETTI, M. et al. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. **Am. J. Physiol., Cell Physiol**, vol. 282, p. C947–C970, 2002.

PETITCLERC, E. et al. New Functions for Non-collagenous Domains of Human Collagen Type IV novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth in vivo*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, p. 8051-8061, 2000.

RIGOT, V. et al. Integrin ligation and PKC activation are required for migration of colon carcinoma cells. **Journal of Cell Science**. vol. 111, p. 3119-3127, 1998.

RINI, B.I. et al. Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor targeted therapy in renal cell carcinoma. **J. Clin. Oncol**, vol. 23, p. 1028–1043, 2005.

ROBERTO P.G., et al. Cloning and Identification of a Complete cDNA coding for Bactericidal and Antitumoral Acidic Phospholipase A2 from Bothrops jararacussu Venom. **The Protein Journal**, vol.23, p. 273-285, 2004.

RODRIGUES, V. M. et al. Geographic variations in the composition of myotoxins from Bothrops neuwiedi snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, vol. 121, p. 215-222, 1998.

RODRIGUES V.M., et al., Comparative biochemistry and physiology. Part A, **Molecular & integrative physiology**, vol. 121, p. 215-222, 1998.

RODRIGUES, V. M. et al. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A2 from Bothrops neuwiedi pauloensis snake venom. **Toxicon**, vol. 44, p. 305-314, 2004.

RODRIGUES, R. S. et al. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A(2) from Bothrops pauloensis snake venom. **Toxicon**, vol.50, p. 153-165, 2007.

RODRIGUES, R. S., et al. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from Bothrops pauloensis snake venom. **Biochimie**, vol. 91, p. 490-501, 2009.

RODRIGUES, R.S. et al. Snake Venom Phospholipases A2: A New Class of Antitumor Agents. **Protein & Peptide Letters**, vol.16, p. 894-898, 2009.

RODRIGUES, V. M. et al. Bothrops pauloensis Snake Venom Toxins: The Search for New Therapeutic Models. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, vol.15, p. 670- 684, 2015.

SAWYERS, L.C. Making Progress through Molecular Attacks on Cancer. **Cold Spring Harbour Laboratory Press**, vol. 70, p. 479-482, 2015.

SCHALOSKE, R.H. et al. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys Acta**, vol.1761, p.1246–1259, 2006.

SENO, H. et al. Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps. **Cancer Res**, vol. 62, p.506–511, 2002.

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.**, vol. 378, p. 201-209, 2000.

SONOSHITA, M. et al. Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc(Delta 716) knockout mice. **Nat Med**, vol. 7, p. 1048–1051, 2001.

TANG, N. et al. Loss of HIF-1 α in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 6, p. 485–495, 2004.

TÍMÁR, J. Angiogenesis-Dependent Diseases and Angiogenesis Therapy. **Pathology Oncology Research**, vol 7, p. 85-94, 2001.

VYAS, V. K. et al. Therapeutic potencial of snake venom in cancer therapy: current perspectives. **APJTB**, vol.3, p. 156-162, 2013.

WAITE, M. Handbook of Lipid Research. **Plenum Press**, New York, 1987.

WANG, D. et al. Eicosanoids and cancer. **Nature Rev. Cancer**, vol. 10, p. 181–193, 2010.

WENDUM, D. et al. Cytoplasmic phospholipase A2 alpha overexpression in stromal cells is correlated with angiogenesis in human colorectal cancer. **Modern Pathology**, vol. 18, p. 212–220, 2005.

YAN, C. et al. Autophagy is involved in cytotoxic effects of crotoxin in human breast cancer cell line MCF-7 cells. **Acta Pharmacol Sin.** v. 38, p. 540-548. 2007.