MIRYAM GUILLERMINA PALOMINO RODRIGUEZ

**Avaliação dos efeitos antitumorais da
metaloproteinase ofídica jararagina
no adenocarcinoma de mama**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

Versão original

São Paulo
2012

RESUMO

PALOMINO RODRIGUEZ M. G. **Avaliação dos efeitos antitumorais da metaloproteinase ofídica jararagina no adenocarcinoma de mama.** 2012. 171 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Jararagina é uma metaloproteinase do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, capaz de alterar diversas funções em modelos experimentais, como homeostasis, coagulação, inflamação, migração celular, liberação de citocinas, mostrando-se um agente potencial antiproliferativo e pró-apoptótico em células tumorais. Neste trabalho foram investigados os efeitos *in vitro* da jararagina, em modelo de células de tumores de mama humana MCF7, T47D e murina (“Tumor de Ehrlich”), além de células de fibroblastos normais e células endoteliais. Foram avaliados a viabilidade celular, alterações na morfologia, modificações nas fases do ciclo celular e tipo de morte celular. Os efeitos *in vivo* foram realizados no modelo murino de carcinoma de Ehrlich nas formas ascítica e sólido-ortotópica em camundongos BALB/c. Os resultados obtidos *in vitro* mostraram que a jararagina diminui, significativamente, a viabilidade celular e adesão ao substrato de maneira dose dependente. Morfologicamente foram detectadas a formação de agregados multicelulares no sobrenadante, estruturas tipo esferoides e a formação túbulo-acinar em células de tumor de mama humana, ativando mecanismos de sobrevivência, entretanto as células de adenocarcinoma murino mostraram sensibilidade à toxina, e as células normais mostraram morte por apoptose. O tratamento *in vivo* mostrou o aumento de infiltrado inflamatório e resposta imunológica sistêmica, com desvio a esquerda. Os parâmetros antitumorais, não mostraram diminuição no volume tumoral presente na cavidade abdominal no modelo do tumor ascítico, entretanto, no modelo ortotópico, a jararagina induz exacerbação da resposta inflamatória local, e intensa remodelação da matriz extracelular, com alterações na distribuição e organização das fibras de colágeno. Conclui-se que a jararagina induz citotoxicidade nas linhagens de células tumorais de mama e normais. *In vivo*, o tratamento dos animais portadores de tumores a jararagina não reduziu o volume tumoral, entretanto foi capaz de induzir inflamação intratumoral e estimulação sistêmica, com efeitos modulatórios distintos, ao longo do crescimento e disseminação das células tumorais.

Palavras-chave: Jararagina. Câncer de mama. Tumor de Ehrlich. Inflamação. Apoptose.

ABSTRACT

PALOMINO RODRIGUEZ M. G. **Evaluation of antitumor effects of ophidic metalloproteinase jararhagin in breast adenocarcinoma.** 2012. 171 p. Masters thesis (Biothecnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Jararhagin is a metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*, able to change various functions in experimental models, such as homeostasis, coagulation, inflammation, cell migration, cytokine release, proving to be an antiproliferative and pro-apoptotic potential agent in tumor cells. In this work, we have studied the *in vitro* effects of jararhagin in MCF7 and T47D human and murine (“Ehrlich tumor”) breast tumor cellular models, and normal fibroblast and endothelial cells. We assessed cell viability, morphological changes, cell cycle phases alterations and cell death. The *in vivo* effects were performed on murine model of Ehrlich ascitic and solid-orthotopic carcinoma in BALB / c mice. The *in vitro* results showed that jararhagin significantly decreases cell viability and adherence to the substrate in a dose dependent manner. Morphologically, were detected the formation of multicellular aggregates in the supernatant, spheroids structures and tubulo-acinar formation in breast human tumor cells, activating mechanisms of survival in human breast tumor cells, whereas murine adenocarcinoma cells showed sensitivity to the toxin, and the normal cells showed apoptosis death. The treatment in vivo showed increased inflammatory infiltrate and systemic immune response, with a left shift. The antitumor parameters showed no decrease in tumor volume present in the abdominal cavity in ascites tumor model, however, the orthotopic model, the Jararhagin induces exacerbation of local inflammatory response, and intense remodeling of extracellular matrix, with changes in the distribution and organization of the fibers collagen. It is concluded that jararagina induces cytotoxicity in tumor cell lines and normal breast. In vivo, the treatment of animals bearing Ehrlich tumor, the jararhagin not reduce tumor volume, but was able to induce systemic inflammation intratumoral and stimulation with distinct modulatory effects along the growth and dissemination of tumor cells.

Keywords: Jararhagin. Breast cancer. Ehrlich tumor. Inflammation. Apoptosis. Toxin.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de doenças provocado por modificações no crescimento e controle das células, considerado um problema de saúde pública (AMERICAN CÂNCER SOCIETY, 2012). O câncer de mama é o segundo tipo mais frequente de câncer no mundo e o mais comum entre as mulheres. No Brasil, segundo os dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de mama é o tipo de neoplasia mais prevalente em mulheres com uma estimativa de 52.680 casos novos no ano 2012, e com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2012).

No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados. Nos países em desenvolvimento, a sobrevida média após cinco anos é 60%, entretanto, nos países desenvolvidos, a sobrevida média está em torno de 85% (INCA, 2012), sendo o câncer da mama invasivo e metastático a principal causa de mortalidade.

A classificação da doença é baseada tradicionalmente na histologia e estágio do tumor, sendo o 95% classificados como adenocarcinoma, os quais são divididos em carcinoma *in situ* e invasivo.

O carcinoma de mama *in situ* representa de 15 a 20% das lesões, é subclassificado como ductal (80%) ou lobular (20%) sendo que padrões de crescimento e características citológicas formam a base para distinguir entre os dois tipos. Enquanto que, o carcinoma de mama invasivo representa de 80-85% das lesões, e compreendem um grupo heterogêneo de tumores diferenciados em subtipos histológicos. Os principais subtipos invasivos incluem ductal, lobular, ductal/lobular, colóide, tubular, medular e carcinoma papilar. Destes, o carcinoma ductal invasivo é o mais frequente subtipo, representando de 70-80% de todas as lesões invasivas (POLYAK, 2007).

Neste sentido a busca de novos compostos e estratégias terapêuticas seletivas com alvos moleculares definidos que auxiliem no tratamento ou em sinergismo com outros medicamentos, são procurados na pesquisa básica.

As toxinas de veneno de serpente são uma fonte biológica de diferentes peptídeos, enzimas e toxinas farmacologicamente ativas, com grande potencial terapêutico. A jararagina é uma toxina isolada do veneno da serpente *Bothrops*

jararaca que apresentar domínios estruturais importantes nas funções biológicas, apresentando grande versatilidade e consequente importância médica.

No presente trabalho, baseados nos resultados *in vitro* e *in vivo* obtidos em células de melanoma maligno Skmel-28 e camundongos tratados com jararagina e diminuição do número de metástases pulmonares, com potencial terapêutico (CORREA et al., 2002; KLEIN et al., 2010; MARIA et al., 2001), foram estudados os efeitos *in vitro* da toxina ofídica jararagina em células do tumor de mama humano e murino, assim como em células normais, e os efeitos *in vivo* no modelo experimental de carcinoma murino de Ehrlich forma ascítica e sólida em camundongos BALB/c.

1.1 Revisão da literatura

1.1.1 A mama humana

A mama humana é formada por um complexo sistema de ductos ramificados a partir do mamilo que se alargam para formar um saco (tecido glandular), envolvido por um denso estroma constituído de tecido adiposo e tecido conjuntivo fibroso, além de vasos sanguíneos, vasos linfáticos e linfonodos (SCHMITT; GOBBI, 2006). O complexo sistema de dutos ramificados da mama está organizado em 15 a 20 seções chamadas de lobos, onde cada lobo contém estruturas menores chamados de lóbulos onde o leite é produzido, passando por dutos que se reúnem entre si e formam dutos maiores que acabam saindo no mamilo.

Na glândula mamária há dois tipos principais de compartimentos: o epitélio (luminal e basal) e o estroma. O epitélio luminal forma os ductos e o alvéolo secretório; enquanto o epitélio basal consiste essencialmente de células mioepiteliais. Estes dois tipos de epitélio formam uma estrutura bi-camada de epitélio simples que é incorporado ao estroma (WATSON; OLIVER; KHALED, 2011). O estroma da glândula mamária esta formado por numerosos tipos de células, incluindo *stem cells* somáticas, fibroblastos, células do sistema imune, adipócitos, neurônios e vasos sanguíneos, constituindo o microambiente da normal da glândula mamária (HENNIGHAUSEN; ROBINSON, 2005).

Durante a carcinogênese, fenômeno que acontece no tecido, o microambiente é uma parte integral e essencial do câncer. Além das mutações genéticas, existe um desequilíbrio na troca dinâmica de informações entre as células e o microambiente,

que envolve a progressão sequencial de estágios patológicos e clínicos bem definidos, começando com hiperproliferação epitelial e progredindo para carcinoma de mama.

1.1.2 Matriz extracelular (MEC)

A matriz extracelular (MEC) regula o comportamento celular e orchestra as funções celulares durante a formação tecidual e a homeostase, principalmente devido a sua organização tridimensional e a processos de remodelamento decorrentes de proteólise, proporcionando sinais bioquímicos e físicos que controlam a morfologia, adesão, mobilidade, sobrevivência, polaridade, proliferação, diferenciação e morte celulares (EGEBLAD; RASCH; WEAVER, 2010; LUKASHEV; WERB, 1998)

A comunicação entre as células e o seu microambiente ocorre por meio de uma rede complexa de sinais gerados pela adesão célula-MEC, célula-célula e moléculas de junção, assim como pela colaboração entre os tipos de células epiteliais, estromais e outros de órgãos específicos. A MEC e as células apresentam uma relação dinâmica e recíproca, levando a uma comunicação bidirecional via integrinas. Esta família de receptores de superfície celular fixam as células à matriz, e regulam os sinais físicos e químicos de maneira bidirecional. (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999). O microambiente fornece sinalizações cruciais para manter a arquitetura dos tecidos, inibir o crescimento celular e suprimir ou reverter o fenótipo maligno, da mesma forma, sinais incorretos do microambiente devem levar à desestabilização da homeostase do tecido e iniciação e promoção de células normais para a malignidade (BISELL; HINES, 2011).

A MEC também regula diretamente os fatores de crescimento. Muitos fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), ligam-se a importantes moléculas da matriz, incluindo o sulfato de heparina e fibronectina. O reservatório de fatores de crescimento na MEC facilita as gradientes intersticiais, estabelece uma reposição de fatores de crescimento tecido-específico em caso de lesões, estas proteínas servem como co-fatores importantes na apresentação de fatores de crescimento para os seus receptores específicos, como é o caso do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento transformante beta (TGF- β) (HYNES, 2009).

Estudos têm demonstrado que o estroma modifica o fenótipo epitelial. Na carcinogênese, as mudanças no estroma tais como o recrutamento de células inflamatórias, a remodelação da matriz extracelular, ativação de fibroblastos e promoção de angiogênese co-evoluem com a progressiva transformação epitelial (LITTLEPAGE; EGEBLAD; WERB, 2005). Esta interação é importante na progressão do tumor e sucesso para a resposta ao tratamento.

Sinais do estroma e epitélio aberrante podem existir muito antes há carcinoma evidente, aumentando a densidade do estroma, fato correlacionado com a maior probabilidade de desenvolver câncer de mama (BOYD et al., 2007).

Mesmo na ausência de sinais evidentes e visíveis a partir do estroma, as células epiteliais acumulam mutações, mudam de forma (atipia), perdem a polaridade e crescem no lúmen ductal para formar o carcinoma ductal in situ. O comprometimento da integridade da membrana basal ou camada mioepitelial permite que as células luminais estabeleçam contactos com os componentes da MEC, tais como o colágeno I. Por sua vez, isto conduz a sinais de polaridade aberrante, super-regulação de metaloproteínases da matriz (MMPs) que digerem as proteínas do estroma, invasão e metástase. Ao mesmo tempo, moléculas de adesão liberam fatores de crescimento e outros fatores associados à sinalização, que recrutam as células derivadas da medula óssea (macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células estaminais mesenquimais) para o estroma associados aos fibroblastos que se tornam ativados e hiper-vascularização no tumor (BISSELL; HINES, 2011; LITTLEPAGE; EGEBLAD; WERB, 2005),. Alguns estudos sugerem que os macrófagos criam um ambiente inflamatório que é mutagênico e promove o crescimento do tumor, estimulando a angiogênese, aumentando a migração e invasão das células tumorais, e suprimindo a imunidade antitumoral (QUIAN; POLLARD, 2010).

Sob as condições de homeostase do tecido normal, o microambiente exerce forças repressivas para manter o tumor baixo controle (inferior esquerda). Mas o microambiente pode também ser permissivo para o crescimento do tumor, e a combinação de agentes mutagênicos, inflamação, fatores de crescimento e de outros tecidos associados a forças promocionais podem romper a barreira à formação de tumor, resultando em desenvolvimento do câncer (superior direito - Figura 1).

Figura 1- O microambiente do tecido normal e a tumorigênese.

Fonte: Bissell e Hines, 2011

Durante a formação de metástases a distancia as células tumorais invadem os tecidos adjacentes e migram através da interação com as proteínas da MEC e outras células do estroma, células endoteliais e plaquetas. A mobilidade aumentada das células tumorais no passo inicial da metástase é semelhante a um processo normal chamado de transição epitélio - mesenquimal, que é necessária para o movimento a grande escala das células no desenvolvimento embrionário, na remodelação do tecido e na cicatrização de feridas.

1.1.3 Fibroblastos

Os fibroblastos são células de origem mesenquimal, que sintetizam os componentes fibrilares (colágeno e elastina), e não fibrilares (glicoproteínas e proteoglicanos) da MEC do tecido conjuntivo. Os fibroblastos são responsáveis pela formação e remodelação da matriz extracelular, produção de colágeno tipo I, III, V e fibronectina, regulação da diferenciação do epitélio, regulação da inflamação e envolvimento no processo de cicatrização de feridas (MORAES; JOAZEIRO, 2005; PARSONAGE et al., 2005). Os fibroblastos contribuem na formação de membranas basais, pela secreção de laminina e de colágeno tipo IV, além da constante remodelação da MEC pela produção de proteínas, e são imprescindíveis na manutenção da homeostasia do tecido epitelial pela secreção de fatores de crescimento e pela interação direta com a célula epitelial (WISEMAN; WERB, 2002).

Em condições normais, os fibroblastos apresentam baixo índice proliferativo e mínima capacidade metabólica. Entretanto na injúria tecidual os fibroblastos dão início ao processo proliferativo e a liberação de um grande número de componentes da MEC. Estes fibroblastos ativados são potentes produtores de diferentes quimiocinas as quais recrutam células sanguíneas para o local de ferimento (GABBIANI, 2003).

O controle da atividade crítica dos fibroblastos envolve ativação de vias de sinalização intracelulares induzidas por citocinas multifuncionais, como os membros da superfamília do TGF- β e outras citocinas. A interleucina 1 (IL-1) e fatores liberados por granulócitos, apresentam potencial pro-fibrótico e estimulam a síntese de colágeno (CARVALHO; MORAES; JOAZEIRO, 2005). Os fibroblastos e células endoteliais são os principais produtores de fibronectina, moléculas também importantes para a cicatrização de feridas através da ativação de células inflamatórias de quimiotaxia e coagulação no estroma ativado (BEACHAM; CUKIERMAN, 2005).

Os fibroblastos presentes em diferentes tumores sólidos, chamados de fibroblastos associados ao câncer (CAFs) são funcionalmente e fenotipicamente distintos dos fibroblastos normais (LI; FAN; HOUGHTON, 2007), e contribuem para o crescimento e progressão tumoral por permanecerem constantemente ativados (BEACHAM; CUKIERMAN, 2005).

Os tumores são conhecidos como as feridas que não cicatrizam - isto implica que as células que estão envolvidas na angiogênese e a resposta à lesão, tais como as células endoteliais e fibroblastos. Os fibroblastos estão associados a células de câncer em todas as fases da sua progressão, e suas contribuições estruturais e funcionais a este processo estão começando a surgir. A produção de fatores de crescimento, quimiocinas e da matriz extracelular por parte dos fibroblastos, facilita o recrutamento angiogênico de células endoteliais e pericitos. Os fibroblastos são, portanto, um fator determinante na progressão maligna e representam um importante alvo para terapias contra o câncer (KALLURI; ZEISBERG, 2006).

1.1.4 Integrinas

As integrinas são glicoproteínas heterodiméricas, que apresentam as subunidades α e β associadas não covalentemente, com diferentes combinações de $\alpha\beta$ fornecendo ligação e sinalização específica (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999). São descritas pelo menos 18 subunidades α e 8 subunidades β , com 24 diferentes combinações entre elas. Cada heterodímero α/β possui uma determinada especificidade, sendo algumas integrinas capazes de interagir com um amplo grupo composto de diferentes ligantes, e outras restritas à ligação com poucos ligantes (HYNES, 2002).

As integrinas estão implicadas em funções biológicas como embriogênese, resposta imune, homeostase, inflamação e manutenção da integridade tecidual, atuando como receptores de sinalização, entre a MEC e o citoesqueleto de actina, sinalizando em ambas as direções da membrana celular (SCHWARTZ, 2001).

As integrinas conectam o citoesqueleto de actina intracelular com a MEC, e assim, formando uma rede para detectar e responder a forças mecânicas. As integrinas podem iniciar sinais pró-sobrevivência, bem como pro-apoptóticas que depende do estado de ligação das integrinas expressas na superfície por uma determinada célula. Em uma célula na qual a maioria das integrinas estão ligados, um precursor pro sobrevivência é iniciado através do aumento do fator nuclear-kB (NF-kB) ou atividade da via PI3K-AKT, diminuição de ativação de p53 e expressão aumentada de moléculas pró-sobrevivência Bcl-2 e FLIP (também conhecido como CFLAR).

As sinalizações conjuntas entre os receptores de fator de crescimento e integrinas também ativa Raf conduzindo a mecanismos distintos de sobrevivência celular. Sinalizações através de integrina $\alpha_v\beta_3$ e o receptor do fator de crescimento de fibroblastos promove a fosforilação de Ser338 e Ser339 da Raf, protegendo as células da via intrínseca da apoptose, e integrina $\alpha_v\beta_5$ e o receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 fosforilam Tyr340 e Tyr341 de Raf, para prevenir a apoptose através da via extrínseca. Em células aderentes em que muitas das integrinas estão sem ligação, estas iniciam a clivagem da caspase 8, desencadeando a apoptose através da integrina mediada por morte (IMD). Na perda completa de adesão, a morte celular é iniciada através de um processo denominado anoikis. A apoptose induzida por anoikis pode prosseguir tanto através das vias intrínseca e extrínseca (FRISCH; SCREATON, 2001).

Figura 2 - Esquema representativo da sobrevivência e das vias apoptóticas mediada por integrinas

Fonte: Desgrosellier e Cheresh, 2010.

A potenciação da sinalização por fator de crescimento através das integrinas via Ras-Raf-MEK-ERK, também podem potenciar a proliferação celular pela expressão de ERK, um processo que pode depender de adesão celular. Além disso, o aumento da adesão relacionada com phosphoinoside 3 - quinase é importante para a expressão e estabilidade de ciclina D1 (FRISCH; SCREATON, 2001).

A perda de contato célula - substrato da MEC pela privação de ligação das integrinas resulta em um tipo especial de apoptose (STUPACK; CHERESH, 2002) nomeado de anoikis (FRISCH; FRANCIS, 1994), e é definido como consequência da falta de sinais de sobrevivência relacionada à perda de interações células-matriz e inibição da sinalização mediada por integrinas (SCHWARTZ et al., 2001). Além da perda de vias mitogênicas, anoikis resulta também da inativação de proteína anti-apoptótica Bcl-2, devido à liberação de Bmf (fator pró-apoptótico) normalmente ligado ao citoesqueleto (PUTHALAKATH et al., 2001). Falha de anoikis é um processo importante na carcinogênese.

As diferenças aparentes entre as estruturas do citoesqueleto de células aderentes e em suspensão sugerem que a sinalização de sobrevivência em anoikis é susceptível de ser regulado extensivamente pelo citoesqueleto. A arquitetura do citoesqueleto provavelmente afeta as das interações das integrinas no espaço tridimensional, estas alterações do citoesqueleto conferem aparente resistência a anoikis nas células transformadas (FRISH; SCREATON, 2001).

Uma grande variedade de integrinas contribuem para a progressão do tumor, contribuindo na proliferação, migração e sobrevivência das células tumorais. No entanto, a expressão da integrina podem também variar consideravelmente entre o tecido normal e tumoral. Os níveis de expressão da integrinas $\alpha 2\beta 1$, diminui em células tumorais, aumentando potencialmente a dissemination da célula tumoral. Assim, a re-expressão de $\alpha 2\beta 1$ em células de câncer de mama diminui algumas das propriedades malignas, o que sugere que $\alpha 2\beta 1$ poderia funcionar como um supressor de tumor. A correlação dos níveis de expressão de integrinas em tumores humanos, com resultados patológicos, como a metástase, identificaram várias integrinas que podem ter um importante papel na progressão do câncer (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010).

Varias classes de integrinas reconhecem a sequencia RGD (Arginina-Glicina-Asparagina) em proteínas da MEC, esta sequência RGD é distribuída em uma

grande variedade de proteínas de adesão, constituindo o principal sistema de reconhecimento pelas integrinas (RUOSLAHTI, 1996).

As desintegrinas presentes em veneno de várias espécies de serpente, assim como as proteínas da MEC, contém a sequência RGD que se liga seletivamente a receptores integrinas da superfície celular envolvidos nas interações célula – matriz, inibindo as funções das integrinas e promovendo a transdução de sinais. Os sinais variam segundo a toxina, que podem induzir a reorganização do citoesqueleto, a expressão de novos tipos de moléculas de adesão e alterações do complexo de adesão focal. Estes estudos dos processos biológicos envolvendo a adesão celular mediada por integrinas representam uma promissora área de investigação para o desenvolvimento da terapêutica anti-câncer, além da compreensão da biologia das toxinas (CALVETE et al., 2005; GUTIERREZ et al., 2005; KAMIGUTI; HAY; ZUZEL, 1996).

1.1.5 Venenos de serpentes, experimentos em modelos de câncer.

O veneno de serpente é uma fonte de complexa mistura de componentes como metaloproteinases, fosfolipases, serinoproteases, lectinas tipo-C, desintegrinas, entre outros, sintetizados nas glândulas exócrinas modificadas (VARANDA; GIANINNI, 1994). O veneno apresenta componentes orgânicos e inorgânicos. Na composição orgânica, encontram-se os carboidratos, glicoproteínas, lipídeos, fosfolipídios, aminas biogênicas, aminoácidos e nucleotídeos, representando 90-95% de proteínas do peso seco do veneno; enquanto na composição inorgânica se encontram metais como o zinco, cobre, ferro e cobalto, etc., envolvidos com os mecanismos catalíticos de componentes enzimáticos. (BJARNASON; FOX, 1994; MARKLAND, 1998).

Os venenos de serpente têm sido amplamente investigados há anos, na busca do isolamento de seus componentes ativos que participam nos processos biológicos, tais como adesão, migração, proliferação, angiogênese, agregação plaquetária, entre outros. Foram identificadas mais de duzentas espécies de serpentes venenosas, classificadas em quatro principais famílias: Hydrophilidae, Elapidae, Viperidae e Crotalidae (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000), caracterizando-se o veneno das duas primeiras famílias por ser altamente neurotóxico, e das duas últimas por causar choque, coagulação intravascular,

hemorragia local e sistêmica, edema e necrose tecidual (NIEWIAROWSKI et al., 1994). Nos venenos de serpentes existem dois tipos principais de proteases, classificadas de acordo a sua estrutura, como as serinoproteases e as metaloproteases.

As Metalloproteases de Veneno de Serpentes (SVMPs) apresentam um dos primeiros relatos do teor de metal zinco em proteases procedentes de toxinas hemorrágicas, sendo isoladas em grande numero nos últimos anos.

Estruturalmente, na organização dos seus domínios, as SVMPs estão classificadas em três classes: P-I enzimas que contém só o domínio metaloproteinase (M), P-II composta por domínio M e domínio desintegrina, e P-III que contem os domínios M, desintegrina-like (D) e rico em cisteína (C) (FOX; SERRANO, 2005, 2008). A classe PIII é subdividida em subclasses, baseadas nas distintas modificações pós-traducionais, tais como homodimerização (P-IIIc), ou proteólise entre o domínio M e D (P-IIIb), presença de um domínio adicional lectina-*c-like* (P-IIId) derivado de uma modificação pós-traducional da classe padrão P-III (P-IIIa) das SVMPs (CLEMETSON; MORITA; MANJUNATHA, 2009).

Figura 3 - Diagrama esquematizando a estrutura dos domínios de SVMPs e as moléculas relacionadas.

As SVMPs constituem uma importante família de toxinas, associadas com a hemorragia e a disrupção da hemostasia, mediado pela atividade proteolítica do domínio M. SVMPs causam hemorragia pela degradação das proteínas envolvidas nas interações entre as células endoteliais e a membrana basal (integrina, cadelina) e componente da membrana basal (fibronectina, laminina, colageno tipo IV). A hemorragia é responsável pela hemorragia local e sistêmica induzida pelos venenos viperídeos, apresentam um grande potencial de interferência na resposta inflamatória, seja por liberação exógena de citocinas ou por inibição da adesão presentes na superfície celular como nas células endoteliais (MARKLAND, 1998; TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012)

Várias toxinas de venenos de serpentes inibem a adesão de células tumorais, migração e a formação de metástase em modelos experimentais (CORREA et al., 2002; SHEU, et al., 1992). As desintegrinas, além da inibição da agregação plaquetária, têm mostrado outras utilidades como agente terapêutico em trombose arterial, osteoporose, e angiogênese (HUANG et al., 1998). In vitro têm mostrado as atividades de diversas desintegrinas, como a albolabrin e a eritostatina (*Eristocophis macmahoni*) com efeitos na perda da adesão das células de melanoma murino às proteínas da MEC, como fibronectina, laminina e vitronectina. Células de melanoma maligno murino e melanoma humano MV3 pre-tratadas com eritostatina diminuíram o número de metástases no fígado e pulmão (BEVIGLIA; STEWART; NIEWIAROWSKI, 1995; MORRIS et al., 1995), provavelmente ao fato da ligação da eritostatina a receptores integrina $\alpha_4\beta_1$, altamente expressas em células metastáticas (DANEN et al., 1998). Triflavina obtida de *Trimeresurus flavoviridis* inibe a adesão de células de melanoma B16F10 à MEC e a formação de metástase no pulmão em camundongos C57BL/6 de maneira dose dependente (SHEU et al., 1992). O pré-tratamento das células B16F10 com salmosina (*Agkistrodon halys brevicaudus*) inibe a proliferação e os efeitos metastáticos no parênquima pulmonar, atribuído à ligação da integrina $\alpha_v\beta_3$ na superfície das células tumorais (KANG et al., 2000). Rodostomina (*Calloselasma rhodostoma*) em células endoteliais (HUVEC) inibe a migração, invasão e formação de tubos em matrigel induzida pelo fator de crescimento de fibroblastos bFGF, provavelmente pela união às integrinas $\alpha_v\beta_3$. No melanoma B16F10 tratados pela via subcutânea com rodostomina, apresentaram aumento da taxa de sobrevivência (YEH et al., 2001). Jararagina-C de *Bothrops jararaca* inibe a agregação plaquetária e a adesão das células ECV-304, endoteliais HUVEC

e células transfectadas com a integrina $\alpha_2\beta_1$, ao colágeno tipo I (MOURA-DA-SILVA; MARCINKIEWICZ; NIEWIAROWSKI, 2001). Alternagina-c (*Bothrops alternatus*) inibe a agregação plaquetária mediada pelo colágeno tipo I em células murinas transfectadas (K562- $\alpha_2\beta_1$), de maneira dose dependente (SOUZA et al., 2000).

A contortrostatina (*Agkistrodon contortrix contortrix*), uma desintegrina homodimérica que apresenta a sequência RGD, *in vitro* apresenta propriedades anti-adesivas e anti-invasivas capaz de inibir a interação das integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, e/ou $\alpha_5\beta_1$ presentes em células tumorais e endoteliais. *In vivo* mostrou potente atividade antitumoral e antiangiogênica no modelo de xenoinxerto ortotópico de tumor de mama humano com células MDA-MB-435 em camundongos nude (ZHOU et al., 2000). A eficácia *in vivo* do tratamento em formulação liposomal com contortrostatina (LCN), via intravenosa e intratumoral em modelo ortotópico de xenoinxerto de câncer de mama MDA-MB-435 e câncer de ovário A2780 aumenta significativamente o tempo de meia-vida da CN, quando comparada à proteína não encapsulada (SWENSON et al., 2004). Em 2007, Son e colaboradores mostraram que o tratamento por 24 horas com o veneno de cobra *Vivera lebetina turanica*, inibe o crescimento de células de tumor de próstata andrógeno independentes PC-3 e DU145, com IC_{50} de 1,7 e 1,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O mecanismo da ação da toxina é a inibição do fator nuclear NF- κB , que é um fator de transcrição antiapoptótico, e assim induz a morte celular por apoptose, e aumenta a expressão de proteínas pro-apoptóticas como p53, Bax e caspase-3.

1.1.6 Jararagina

A jararagina, purificada do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, família Viperidae, é uma protease zinco-dependente, pertencente à família Reprolisina (PAINE et al., 1992). Apresenta 52 kDa e estruturalmente pertence à classe P-III das SVMs, apresentando o domínio metaloproteínase, seguido dos domínios tipo desintegrina e rico em cisteína. A jararagina é um dos principais componentes do veneno, responsáveis pela hemorragia local e sistêmica do veneno, apresentando atividade proteolítica sobre a MEC e componentes da membrana basal dos capilares, e proteínas plasmáticas importantes na hemostasia. Além de inibir a agregação plaquetária estimulada pelo colágeno tipo 1 via integrina $\alpha_2\beta_1$ e inibe

eventos de sinalização intracelular mediados pelo colágeno (KAMIGUTI; HAY; ZUZEL, 1996; MOURA-DA-SILVA et al., 2001).

O domínio metaloproteinase ou catalítico é dependente de zinco e responsável pela função hemorrágica, degradando enzimaticamente os componentes da membrana basal do endotélio (BJARNASON; FOX, 1994). O domínio tipo-desintegrina não RGD, por apresentar a substituição do tripeptídeo RGD pela sequência ECD (Glu-Cys-Asp), inibe a agregação plaquetária pela ligação sobre as integrinas $\alpha_2\beta_1$. O domínio cisteína, rico em pontes dissulfeto, favorece a manutenção da forma e rigidez da molécula (KAMIGUTI; HAY; ZUZEL, 1996; TANJONI et al., 2005). Recentemente, Tanjoni et al., 2010, atribuíram ao domínio tipo-desintegrina da jararagina a ligação ao colágeno e ao domínio rico em cisteína a ligação à integrina $\alpha_2\beta_1$; estes dois diferentes tipos de ligação interferem na interação integrina-matriz com consequente apoptose das células endoteliais.

A jararagina tem sido muito utilizada por diferentes grupos de pesquisa no Brasil e em outros centros internacionais. Demonstrou-se que a jararagina (50 $\mu\text{g/mL}$) induziu a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) em células residentes do peritônio de camundongos (CLISA et al., 2001); camundongos deficientes em receptores TNF e IL-6 mostraram a importância destes no desenvolvimento de necrose induzida pela jararagina (LAING et al., 2003). A inoculação da jararagina no tecido subcutâneo dorsal de camundongos estimula o influxo de células inflamatórias, dependendo do tempo e da dose, caracterizada por infiltrado de leucócitos, predominantemente de neutrófilos (COSTA et al., 2002). A administração semanal em camundongos de doses sub-letais, a jararagina provoca significativa leucopenia, aumento de mastócitos e de eritrócitos na fase inicial, mas não causa hemorragia ou inflamação (MARIA; VASSÃO; RUIZ, 2003). Em concentrações 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$ mostrou diminuição da viabilidade celular e efeitos inibitórios na adesão ao substrato em células endoteliais (TANJONI et al., 2005), células de melanoma SKmel-28 e fibroblastos normais (CORREA et al., 2002; KLEIN et al., 2011). A Jararagina em baixas concentrações (1,25; 2,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$) estimula a disseminação, o crescimento de células de neuroblastoma, efeitos acompanhados pelo desarranjo do citoesqueleto, aumento na polimerização de actina e formação de filopódios e lamelipódios associados à motilidade celular (COSTA et al., 2008).

A atividade proteolítica da jararagina causa efeitos pró-inflamatórios pela migração de leucócitos em bolha de ar em camundongos. Em camundongos a

jararagina causo significativas lesões hemorrágicas no pulmão de maneira dose dependente, após 1 e 3 horas de inoculação. Interessantemente, após 24 horas a intensidade das regiões hemorrágicas foi menor quando comparada a áreas coletadas em tempos menores de 30, minutos (COSTA et al., 2002).

A jararagina é rapidamente eliminada da circulação, diminuindo rapidamente os níveis plasmáticos a $19 \pm 3\%$ e $11 \pm 5,9\%$ da dose injetada, após 15 e 60 minutos, respectivamente. A avaliação da biodistribuição da jararagina mostrou altos níveis no fígado e rins, principalmente os primeiros 30 minutos, com diminuição progressiva. A inoculação intravenosa de jararagina marcada radioativamente, e coleta do soro após 5 minutos, mostrou a formação de complexos com proteínas de alta massa molecular (macroglobulinas) presentes no plasma, mas uma pequena porção não é complexada e permanece livre sendo capaz de se associar com alvos da microvasculatura. Estes efeitos farmacocinéticos explicam em parte porque não se produz hemorragia generalizada nos órgãos (ESCALANTE et al., 2003).

1.1.7 Tumor Experimental do adenocarcinoma de mama de Ehrlich

Os tumores transplantáveis trouxeram melhoria na pesquisa de novas técnicas e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas, especialmente para tumores experimentais em animais, que são a base de recentes melhoras na terapia do câncer.

O tumor de Ehrlich foi descrito como um adenocarcinoma de mama murino espontâneo, originário de células epiteliais de carcinoma mamário, e foi utilizado como tumor experimental pelo transplante subcutâneo entre camundongos. Posteriormente, foi descrita a forma ascítica do tumor, desenvolvido no peritônio dos camundongos, e nomearam-o como carcinoma ascítico de Ehrlich pela presença de líquido ascítico junto com as células de carcinoma. O carcinoma ascítico de Ehrlich foi disseminado rapidamente nos institutos de pesquisa pela vantagem de conter células tumorais homogêneas e livres, com a possibilidade de padronização do número de células ser transplantáveis, quantificação do crescimento e estudo da biologia da célula tumoral (DAGLI, 1989; OZASLAN et al., 2011).

O carcinoma de Ehrlich se desenvolve com duas variáveis de comportamento: a forma ascítica (TEA), quando as células são inoculadas intra-peritonealmente e a forma sólida (TES), quando inoculado no subcutâneo, e pode ser transplantado para

qualquer linhagem de camundongo por apresentar inespecificidade, provavelmente devido à perda da expressão do antígeno de histocompatibilidade H2 (CHEN; WATKINS, 1970).

Após a inoculação na cavidade peritoneal o carcinoma ascítico de Ehrlich cresce em suspensão no peritônio, em duas fases: a fase proliferativa na qual o número de células tumorais aumenta exponencialmente, seguido da fase estacionaria (plateau) no qual o número de células permanece quase constante (TANNOK, 1969). Durante a transição da fase proliferativa e a fase estacionaria acontece modificações morfológicas e metabólicas como deterioração estrutural, diminuição do número de mitocôndrias, declínio da concentração do ATP, diminuição da biosíntese de DNA e RNA, diminuição da síntese de proteína, perda de nucleotídeos, nucleósidos e bases, entre outros (OZASLAN, 2011).

O aumento das células tumorais na fase proliferativa acontece paralelamente ao acúmulo do fluido ascítico no peritônio. Os vasos da cavidade peritoneal mostram aumento na permeabilidade da microvasculatura induzida por fatores de permeabilidade vascular presente no fluido ascítico e secretados pelas células tumorais (SENGER et al., 1983). Este exudado proveniente dos vasos é benéfico para as células tumorais porque contribui com a reoxigenação das áreas de hipoxia, melhorando o microambiente e gerando burst de mitose (FREITAS et al, 1991). Após determinado tempo de desenvolvimento do tumor, o animal morre devido à pressão exercida pelo volume do tumor ou pelos danos produzidos pelo tumor.

Na análise histológica do tumor de Ehrlich observa-se células com alto grau de atipia (anaplasia), caracterizadas por nucléolos evidentes e numerosos, cromatina condensada, mitoses atípicas ou aberrantes e relação núcleo-citoplasma maior que o das células normais. O estroma é constituído por fibras colágenas e capilares neoformados (DAGLI, 1989). Donenko em 1992 mostrou que o fluido ascítico conjuntamente dializado com células de tumor de Ehrlich, apresentam efeito protetor *in vivo* nas células tumorais do TEA e teratoma T-36, aumentando a porcentagem da taxa de crescimento.

O tumor de Ehrlich é utilizado como modelo para diversos estudos como metástases disseminadas por via linfática, para verificar a influência de drogas anti-angiogênicas e citotoxicidade, antiinflamatórias, hormônios sexuais (DAGLI; GUERRA; SALDIVIA, 1992; SILVA et al., 2002), e na forma ascítica possui uma

semelhança com os tumores humanos sensíveis a quimioterapia, pelo fato de ser um tumor indiferenciado com rápida taxa de crescimento.

Este modelo experimental tem permitido a análise de desenvolvimento e tratamento de carcinomas, estudos de mecanismos envolvidos nas metástases, teste de substância com ação anti-neoplásica, e novas modalidades terapêuticas que auxiliam na compreensão da resposta imune do hospedeiro, bem como na avaliação da atividade e mecanismo de ação dos compostos, com perspectivas de desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos.

1.2 Objetivo

Avaliar os efeitos antitumorais e sua influência terapêutica *in vitro* e *in vivo* da toxina metaloproteinase ofídica jararagina em linhagens celulares de adenocarcinoma mamário humano e murino, e nos modelos ascítico e ortotópico de tumor de Ehrlich em camundongos BALB/c

5 CONCLUSÕES

- As concentrações inibitórias IC_{50} obtidas neste trabalho mostraram que a Jararagina apresentou citotoxicidade entre as linhagens celulares, sendo mais sensíveis a linhagem endotelial, seguido dos fibroblastos, e das células tumorais de mama;
- as alterações na morfologia e na cinética do crescimento celular, a perda da adesão, sugerem que a Jararagina induz morte celular por anoikis em células normais, enquanto que nas células tumorais ocorreu morte celular por necrose que foram acompanhadas pelo aumento da produção de radicais livres lipoperoxidados;
- nos modelos tumorais *in vivo* do TAE e ortotópico, o tratamento com Jararagina não induz diminuição do volume do tumor, entretanto há uma reação inflamatória local de grande intensidade, diminuição da viabilidade e alteração na ploidia celular;
- avaliações hematológicas mostraram efeitos modulatórios sistêmicos e locais, como também a diminuição dos efeitos colaterais mielossupressores;
- a expressão dos marcadores pró-inflamatórios, da angiogênese e de células endoteliais mostraram, que a Jararagina é um mediador de controle da resposta inflamatória, capaz de mobilizar o infiltrado inflamatório intratumoral, modular a MEC e impedir a migração e proliferação das células tumorais.

REFERÊNCIAS¹

- ALLAVENA, P.; GARLANDA, C.; BORRELLO, M. G.; SICA, A.; MANTOVANI, A. Pathways connecting inflammation and cancer. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 18, n. 1, p. 3-10, 2008.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2012**. Atlanta: American Cancer Society, 2012.
- BARROS, S. F.; FRIEDLANSKAIA, I.; PETRICEVICH, V. L.; KIPNIS, T. L. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Mediators Inflamm.**, v. 7, n. 5, p. 339-346, 1998.
- BEACHAM, D. A.; CUKIERMAN, E. Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. **Semin. Cancer Biol.**, v. 15, n. 5, p. 329-41, 2005.
- BEVIGLIA, L.; STEWART, G. J.; NIEWIAROWSKI, S. Effect of four disintegrins on the adhesive and metastatic properties of B16F10 melanoma cells in a murine model. **Oncol. Res.**, v. 7, p. 7-20, 1995.
- BIERIE, B.; CHUNG, C. H.; PARKER, J. S.; STOVER, D. G.; CHENG, N.; CHYTIL, A.; AAKRE, M.; SHYR, Y.; MOSES, H. L. Abrogation of TGF-beta signaling enhances chemokine production and correlates with prognosis in human breast cancer. **J. Clin. Invest.**, v. 119, n. 6, p. 1571-1782, 2009.
- BISSELL, M. J.; HINES, W. C. Why don't we get more cancer? a proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. **Nat. Med.**, v. 17, p. 320-329, 2011.
- BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.**, v. 62, p. 325-372, 1994.
- BOGDANOV, A. A.; GORDEEVA, L. V.; BAIBAKOV, B. A.; MARGOLIS, L. B.; TORCHILIN, V. P. Restoration of adhesive potentials of Ehrlich ascites carcinoma cells by modification of plasma membrane. **J. Cell Physiol.**, v. 147, n. 1, p. 182-90, 1991.
- BORISH, L.; ROSENBAUM, R.; MCDONALD, B.; ROSENWASSER, L. J. Recombinant interleukin-1 beta interacts with high-affinity receptors to activate neutrophil leukotriene B4 synthesis. **Inflammation**, v. 14, n. 2, p. 151-162, 1990.
- BOYD, N. F.; GUO, H.; MARTIN, L. J.; SUN, L.; STONE, J.; FISHELL, E.; JONG, R.; HISLOP, G.; CHIARELLI, A.; MINKIN, S.; YAFFE, M. J. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 356, n. 3, p. 227-236, 2007.

¹ De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-253, 1976.

CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C.; MONLEON, D.; ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUAREZ, P.; SANZ, L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v. 45, p. 1063-1074, 2005.

CHEN, L.; WATKINS, J. F. Evidence against the presence of H2 histocompatibility antigens in Ehrlich ascites tumor cells. **Nature**, v. 225, p. 734-735, 1970.

CIMPEAN, A. M.; RIBATTI, D.; RAICA, M. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to study tumor metastasis. **Angiogenesis**, v. 11, n. 4, p. 311-319, 2008.

CLEMETSON, K. J.; MORITA, T.; MANJUNATHA, K. R. Scientific and standardization committee communications: classification and nomenclature of snake venom C-type lectins and related proteins. **J. Thromb. Haemost.**, v. 7, p. 360-366, 2009.

CLISSA, P. B.; LAING, G. D.; THEAKSTON, R. D. G.; MOTA, I.; TAYLOR, M. J.; MOURA-DA-SILVA, A. M. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon**, v. 39, p. 1567-1573, 2001.

CORRÊA M. C.; MARIA, D. A.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; PIZZOCARO, K. F.; RUIZ, I. R. G. Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin. **Toxicon**, v. 40, p. 739-748, 2002.

COSTA, E. P.; CLISSA, P. B.; TEIXEIRA, C. F. P.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper venoms induced local inflammation. **Inflammation**, v. 26, p. 13-17, 2002.

COSTA, E. P.; DEL DEBBIO, C. B.; CINTRA, L. C.; COSTA, L. F.; HAMASSAKI, D. E.; SANTOS, M. F. Jararhagin, a snake venom metalloprotease-disintegrin, activates the Rac1 GTPase and stimulates neurite outgrowth in neuroblastoma cells. **Toxicon**, v. 52, p. 380-384, 2008.

COUSSENS, L. M.; RAYMOND, W. W.; BERGERS, G.; LAIG-WEBSTER, M.; BEHRENDTSEN, O.; WERB, Z.; CAUGHEY, G. H.; HANAHAN, D. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. **Genes Dev.**, v. 13, n. 11, p. 1382-1397, 1999.

DAGLI, M. L. Z. **Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo experimental**. 1989. 148 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

DAGLI, M. L. Z.; LORIS, S. C. S.; GUERRA, J. L. Effect of B-carotene on development of sólido Ehrlich tumor mice. **Life Science**, v. 71, p. 717-724, 2002.

DAGLI, M. L. Z.; GUERRA, J. L.; SALDIVA, P. H. N. An experimental study on the lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tumor in mice. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.29, p.97-103, 1992.

DANEN, E. H.; MARCINKIEWICZ, C.; CORNELISSEN, I. M.; VAN, K.A.; PACHTER, J.A.; RUITER, D.J.; NIEWIAROWSKI, S.; VAN, M.G. The disintegrin eristostatin interferes with integrin alpha 4 beta 1 function and with experimental metastasis of human melanoma cells. **Exp. Cell Res.**, v. 238, p. 188–196, 1998.

DE LUCA, M.; WARD, C, M.; OHHMORI, K.; ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Jararhagin and jaracetin: novel snake venom inhibitors of the integrin collagen receptor, $\alpha_2\beta_1$. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 206, p. 570-576, 1995.

DESGROSELLIER, J. S.; CHERESH, D. A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. **Nat. Rev. Cancer**, v. 10, n. 1, p. 9-22, 2010.

DE VIEIRA SANTOS, M. M.; DA SILVA, R. J.; DA SILVA, M. G.; FECCHIO, D. Subpopulations of mononuclear leukocytes associated with inhibition of Ehrlich ascites tumor growth by treatment with *Bothrops jararaca* venom. **Mediators Inflamm.**, v. 13, n. 1, p. 29-32, 2004.

DINARELLO, C. A. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. **J. Infect. Dis.**, v. 163, n. 6, p. 1177-1184, 1991.

DO AMARAL, J. B.; URABAYASHI, M. S.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Cell death and lumen formation in spheroids of MCF-7 cells. **Cell Biol. Int.**, v. 34, n. 3, p. 267-274, 2010.

DONENKO, F. V.; SITDIKOVA, S. M.; KABIEVA, A. O.; MOROZ, L. V. The characteristics of Ehrlich carcinoma recurrence and metastasis. **Biull. Eksp. Biol. Med.**, v. 114, n. 12, p. 652-654, 1992.

EGEBLAD, M.; RASCH, M. G.; WEAVER, V. M. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 22, n. 5, p. 697-706, 2010.

ESCALANTE, T.; NÚÑEZ, J.; MOURA-DA-SILVA, A._M.; RUCAVADO, A.; THEAKSTON, R. D.; GUTIÉRREZ, J. M. Pulmonary hemorrhage induced by jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 193, n. 1, p. 17-28, 2003.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS Journal**, v. 275 n. 12, p. 3016-3030, 2008.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, p. 969–985, 2005.

FREITAS, I.; BARONZIO, G. F.; BERTONE, V.; GRIFFINI, P.; GERZELI, G.; PONTIGGIA, P.; STOWARD, P. Stroma formation in Ehrlich carcinoma. I. Oedema phase. A mitosis burst as an index of physiological reoxygenation? **J. Anticancer Res.**, v. 11, n. 2, p. 569-578, 1991.

FRISCH, S. M.; FRANCIS, H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. **J. Cell Biol.**, v. 124, n. 4, p. 619–626, 1994.

FRISCH, S.; SCREATON, R. Anoikis mechanisms. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 13, n. 5, p. 555-562, 2001.

GABBIANI, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **J. Pathol.**, v. 200, n. 4, p. 500-503, 2003.

GALVEZ, J. **The visible mouse project**: idealized mouse workup for mammary tumorigenesis studies. 1999. Disponível em: <<http://tvmouse.compmed.ucdavis.edu/jaxworkshop/syllabus/workup.htm>>. Acesso em: 04 out. 2011.

GIANCOTTI, F. G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. **Science**, v. 285, p. 1028-1032, 1999.

GIANCOTTI, F. G.; TARONE, G. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** v. 19, p. 173–206, 2003.

GUADAMILLAS, M. C.; CEREZO, A.; DEL POZO, M. A. Overcoming anoikis--pathways to anchorage-independent growth in cancer. **J. Cell Sci.**, v. 124, p. 3189-3197, 2011.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DIAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, p. 997-1011, 2005.

HENNIGHAUSEN, L.; ROBINSON, G. Information networks in the mammary gland. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 6, n. 9, p. 715-725, 2005.

HUANG, T. F. What have snakes taught us about integrins? **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 54, p. 527–540, 1998.

HYNES, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. **Science**, v. 326, n. 5957, p. 1216-1219, 2009.

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

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2012**: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5>. Acesso em: 04 set. 2012.

KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblast in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 392-401, 2006.

KAMATA, P.; TIEU, K. K.; IRIE, A.; SPRINGER, T. A.; TAKADA, Y. Amino acid residues in the alpha IIb subunit that are critical for ligand binding to integrin alpha IIbbeta 3 are clustered in the beta-propeller model. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 47, p. 44275-44283, 2001.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of alpha2 beta1 integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochem. J.**, v. 320, p. 635-641, 1996.

KANG, I.C.; KIM, D.S.; JANG, Y.; CHUNG, K.H. Suppressive mechanism of salmosin, a novel disintegrin in B16 melanoma cell metastasis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 275, p.169-173, 2000.

KE, S.; CHEN, X. H.; ZHU, Z. G.; LI, J. F.; YU, B. Q.; GU, Q. L.; LIU, B. Y. Silencing invariant chains of dendritic cells enhances anti-tumor immunity using small-interfering RNA. **Chin. Med. J. (Eng)**, v. 123, n. 22, p. 3193-3199, 2010.

KENNY, P. A.; LEE, G. Y.; MYERS, C. A.; NEVE, R. M.; SEMEIKS, J. R.; SPELLMAN, P.T.; LORENZ, K.; LEE, E. H.; BARCELLOS-HOFF, M. H.; PETERSEN, O. W.; GRAY, J. W.; BISSELL, M. J. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. **Mol. Oncol.**, v. 1, n. 1, p. 84-96, 2007.

KLEIN, A.; CAPITANIO, J. S.; MARIA, D. A.; RUIZ, I. R. Gene expression in SK-Mel-28 human melanoma cells treated with the snake venom jararhagin. **Toxicon**, v. 57, n. 1, p. 1-8, 2011.

LAING, G. D.; CLISSA, P. B.; THEAKSTON, R. D. G.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; TAYLOR, M. J.; Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin necrosis. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, p. 3458-3463, 2003.

LI, H.; FAN, X.; HOUGHTON, J. * Tumor microenvironment: The role of the tumor stroma in cancer. **J. Cellular Biochemistry**, v.101, n.4, p. 805-807, 2007.

LI, Q.; SATO, E. F.; KIRA, Y.; NISHIKAWA, M.; UTSUMI, K.; INOUE, M. A possible cooperation of SOD1 and cytochrome c in mitochondria-dependent apoptosis. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 40, n. 1, p. 173-181, 2001.

LITTLEPAGE, L. E.; EGEBLAD, M.; WERB, Z. Coevolution of cancer and stromal cellular responses. **Cancer Cell**, n. 7, v. 6, p. 499-500, 2005.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. **Inflammation**, v. 17, n. 2, p. 93-105, 1993.

LONGATTO FILHO, A. E.; MONTIRONI, R. Classification vs. identification in diagnostic quantitative pathology. **Pathologica**, v. 92, n. 1, p. 41-42, 2000.

LOPES, J. P.; FONSECA, E. BRAF gene mutation in the natural history of papillary thyroid carcinoma: diagnostic and prognostic implications. **Acta Med. Port.**, v. 24, n. 4, p. 855-868, 2011.

LUKASHEV, E.; WERB, Z. ECM signalling: orchestrating cell behavior and misbehavior. **Trends Cell Biol.**, v. 8, p. 437-441, 1998.

MAEMURA, M.; AKIYAMA, S. K.; WOODS, V. L.; DICKSON, R. B. Expression and ligand binding of alpha 2 beta 1 integrin on breast carcinoma cells. **Clin Exp. Metastasis**, v. 13, n. 4, p. 223-235, 1995.

MANTOVANI, A.; MARCHESI, F.; PORTAL, C.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Linking inflammation reactions to cancer: novel targets for therapeutic strategies. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 610, p. 112-27, 2008.

MARIA, D. A.; RIBEIRO, O. G.; PIZZOCARO, K. F.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W.; STAROBINAS, N.; GALLOIS, V.; SIQUEIRA M.; SEMAN, M.; IBANEZ, O. M. Resistance to melanoma metastases in mice selected for high acute inflammatory response. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 2, p. 337-342, 2001.

MARIA, D. A.; VASSÃO, R. C.; RUIZ, I. R. Haematopoietic effects induced in mice by the snake venom toxin jararhagin. **Toxicon**, v. 42, n. 6, p. 579-85, 2003.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, p. 1749-1800, 1998.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 146-156, 2000.

MCCORMICK, J. I.; JOHNSTONE, R. M. Identification of the integrin alpha 3 beta 1 as a component of a partially purified A-system amino acid transporter from Ehrlich cell plasma membranes. **Biochem. J.**, v. 1, n. 311, p.743-51, 1995.

MEREDITH, J. E.; FAZELI, B.; SCHWARTZ, M. A. The extracellular matrix as a survival factor. **Mol. Biol. Cell**, v. 4, p. 953-996, 1993.

MORRIS, V.L.; SCHMIDT, E.E.; KOOP, S.; MACDONALD, I.C.; GRATTAN, M.; KHOKHA, R.; MCLANE, M.A.; NIEWIAROWSKI, S.; CHAMBERS, A.F.; GROOM, A.C. Effects of the disintegrin eristostatin on individual steps of hemaogenous metastases. **Exp. Cell. Res.**, v. 219, n. 2, p. 571-578.

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

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

MORAES, G. S.; JOAZEIRO, P. P. Fibroblastos. In: CARVALHO, H. F.; COLLARES-BUZATO, C. B. **Células uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Manole, 2005. p. 22-30.

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

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OKAMOTO, I.; TSUIKI, H.; KENYON, L. C.; GOLDWIN, A. K.; EMLET, D. R.; HOLGADO-MADRUGA, M. LANHAM, I. S.; JOYNES, C. J.; VO, K. T.; GUHA, A.; MATSUMOTO, M.; USHIO, Y.; SAYA, H.; WONG, A. J. Proteolytic cleavage of the CD44 adhesion molecule in multiple human tumors. **Am. J. Pathol.**, v. 160, p. 441-447, 2002.

OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F. T.; ZHOU, T. T.; LIU, B.; BAO, J. K. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Prolif.**, 2012. In Press.

OVERHOLTZER, M.; MAILLEUX, A. A.; MOUNEIMNE, G.; NORMAND, G.; SCHNITT, S. J.; KING, R. W. ET AL. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. **Cell**, v. 131, p. 966-979, 2007.

OZASLAN, M.; KARAGOZ, I.; KILIC, I.; GULDUR, M. Ehrlich ascitic carcinoma, Review. **African J. of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2375-2378, 2011.

PAINE, M. J.; DESMOND, H. P.; THEAKSTON, R. D.; CRAMPTON, J. M. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight from *Bothrops jararaca* venom, **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 22869-22876, 1992.

PARSONAGE, G.; FILER, A. D.; HAWORTH, O.; NASH, G. B.; RAINGER, G. E.; SALMON, M.; BUCKLEY, C. D. A stromal address code defined by fibroblasts. **Trends Immunol.**, v. 26, n. 3, p. 150-156, 2005.

PASZEK, M.J.; ZAHIR, N.; JOHNSON, K. R.; LAKINS, J. N.; ROZENBERG, G. I.; GEFEN, A.; REINHART-KING, C. A.; MARGULIES, S. S.; DEMBO, M.; BOETTIGER, D.; HAMMER, D. A.; WEAVER, V. M. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. **Cancer Cell**. v. 8, n. 3, p. 241-254, 2005.

PINTO, A. E.; ANDRÉ, S.; MENDONÇA, E.; SILVA, G.; SOARES, J. Overall survival in advanced breast cancer: relevance of progesterone receptor expression and DNA ploidy in fine-needle aspirates of 392 patients. **Int. J. Biol. Markers**, v. 18, n. 1, p. 7-12, 2003.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **The J. of Clin. Invest.**, v. 117, n. 11, p. 3155-3163, 2007.

PUTHALAKATH, H.; VILLUNGER, A.; O'REILLY, L.; BEAUMONT, J.; COULTAS, L.; CHENEY, R.; HUANG, D.; STRASSER, A. Bmf: A Proapoptotic BH3-Only Protein Regulated by Interaction with the Myosin V Actin Motor Complex, Activated by Anoikis. **Science**, v. 293, n. 5536, p. 1829-1832, 2001.

QIAN, B. Z.; POLLARD, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 39-51, 2010.

RAO, M.; GUO, D.; PERIANAYAGAM, M. C.; TIGHIOUART, H.; JABER, B. L.; PEREIRA, B. J.; BALAKRISHNAN, V. S. Plasma interleukin-6 predicts cardiovascular mortality in hemodialysis patients. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 45, n. 2, p. 324-333, 2006.

RUOSLAHTI, E. RGD and other recognition sequences for integrins. **Annu. Rev. Cell Biol.**, v. 12, p. 697-715, 1996.

SALGANIK, R. I. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. **J. Am. Coll. Nutr.** v. 20, p. 464S-472S, 2001.

SCHMITT, F.; GOBBI, H. Mama. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo patologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 613-643.

SCHWARTZ, M. A. Integrin signaling revisited. **Trends Cell. Biol.** v. 11, n. 12, p. 466-470, 2001.

SENGER, D. R.; GALI, S. J.; DVORAK, M. A.; PERRUZZI, C. A.; HARVEY, V. S.; DVORAK, H. F. Tumor Cells Secrete a Vascular Permeability Factor That promotes accumulation of ascites fluid. **Science**, v. 219, n. 4587, p. 983-985, 1983.

SHEU, J. R.; LIN, C. H.; CHUNG, J. L.; TENG, C. M.; HUANG, T. F. Triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing antiplatelet peptide inhibits cell-substratum adhesion and melanoma cell-induced lung colonization. **Jpn. J. Cancer Res.** v. 83, p. 885-893, 1992.

SILVA, R. J.; SILVA, M. G.; VILELA, L. C.; FECCHIO, D. Antitumor effect of *Bothrops jararaca* venom. **Mediators Inflammatory**, v. 11, n. 2, p. 99-104, 2002.

SIMPSON, C. D.; ANYIWE, K.; SCHIMMER, A. D. Anoikis resistance and tumor metastasis. **Cancer Lett.**, v. 272, n. 2, p. 177-185, 2008.

SODERGREN, E. **Lipid peroxidation in vivo. Evaluation and application of methods for measurement**. 2000. 78 f. Ph. D. thesis (Medical Science in Geriatrics) - Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine, Uppsala University, Scandinavia, 2005.

SON, D. J.; PARK, M. H.; CHAE, S. J.; MOON, S.O.; LEE, J. W.; SONG, H. S.; MOON, D. C.; KANG, S. S.; KWON, Y. E.; HONG, J. T. 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 kB. **Mol. Cancer Ther.**, v. 6, p. 675-683, 2007.

SOUZA, D. H.; IEMMA, M. R.; FERREIRA, L. L.; FARIA, J. P.; OLIVA, M. L.; ZINGALI, R. B.; NIEWIAROWSKI, S.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits $\alpha 2\beta 1$ integrin-mediated cell adhesion. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 384, n. 2, p.341-350, 2000.

STUPACK, D. G.; CHERESH, D. A. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. **J. Cell Sci.**, v. 115, p. 3729-3738, 2002.

SWENSON, S.; FRITZ, C.; ERNST, W.; FUJII, G.; MARKLAND, M. Contortrostatin, a Snake Venom Disintegrin with Anti-Angiogenic and Anti-Tumor Activity. **Pathophysiol. Haemos. Thromb.**, v. 34, p. 169-176, 2005.

TADDEI, I.; FARALDO, M.; TEULIÈRE, J.; DEUGNIER, MA.; THIERY, JP.; GLUKHOVA, M. A. Integrins in Mammary Gland Development and Differentiation of Mammary Epithelium **J. Mammary Gland. Biol. and Neoplasia**, v. 8, n. 4, p. 383-394, 2005.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1824, n. 1, p. 164-176, 2012.

TANJONI, I.; EVANGELISTA, K.; DELLA-CASA, M. S.; BUTERA, D.; MAGALHÃES, G. S.; BALDO, C.; CLISSA, P. B.; FERNANDES, I.; EBLE, J.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Different regions of the class P-III snake venom metalloproteinase jararhagin are involved in binding to $\alpha 2\beta 1$ integrin and collagen. **Toxicon**. v. 55, n. 6, p. 1093-1099, 2010.

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

TANNOCK, I. F. A comparison of cell proliferation parameters in solid and ascites Ehrlich tumors. **Cancer Res.**, v. 29, n. 8, p. 1527-1534, 1969.

TEIXEIRA, A. S.; ARAÚJO, F. A.; FERREIRA, M. A.; BARCELOS, L. S.; TEIXEIRA, M. M.; ANDRADE, S. P. Angiogenesis and inflammation in skeletal muscle in response to ascites tumor in mice. **Life Sci**. v. 78, n. 14, p. 1637-1645, 2006.

VARANDA, E. A.; GIANINNI, M. J. S. M. Bioquímica de venenos de serpentes. In: Barravieira, B. (Ed.). **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Publicações científicas, p. 205-223, 1994.

WANG, W.; KE, S.; WU, Q.; CHARNSANGAVEJ, C.; GURFINKEL, M.; GELOVANI, J. G.; ABBRUZZESE, J. L.; SEVICK-MURACA, E. M.; LI, C. Near-infrared optical imaging of integrin $\alpha v\beta 3$ in human tumor xenografts. **Mol. Imaging.**, v. 3, n. 4, p. 343-351, 2004.

WATSON, C. J.; OLIVER C.H.; KHALED, W. T. Review. Cytokine signaling in mammary gland development. **J. Reprod. Immunol.**, v. 88, n. 2, p. 124-129, 2011.

WISEMAN, B. S.; WERB Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. **Science**, v. 296, n. 5570, p. 1046-1049, 2002.

YEH, C. H.; PENG, H. C.; YANG, R. S.; HUANG, T. F. Rhodostomin, a snake venom disintegrin, inhibits angiogenesis elicited by basic fibroblast growth factor and suppresses tumor growth by a selective $\alpha(v)\beta(3)$ blockade of endothelial cells. **Mol. Pharmacol.**, v. 59, n. 5, p. 1333-1342, 2001.

YOU, W. K.; SEO, H. J.; CHUNG, K. H.; KIM, D. S. A novel metalloprotease from Gloydus halys venom induces endothelial cell apoptosis through its protease and disintegrin-like domains. **J. Biochem.**, v. 134, p. 739-749, 2003.

ZHOU, Q.; SHERWIN, R. P.; PARRISH, C. RICHTERS, V.; GROSHEN, S. G.; TSAO-WEI, D.; MARKLAND, F. S. Contortrostatin, a dimeric disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix*, inhibits breast cancer progression. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 61, n. 3, p. 249-260, 2000.

ZIGRINO, P.; DRESCHER, C.; MAUCH, C. Collagen-induced proMMP-2 activation by MT1-MMP in human dermal fibroblasts and the possible role of $\alpha2\beta1$ integrins. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 80, n. 1, p. 68-77, 2001.

ZIGRINO, P.; KAMIGUTI, A.S.; EBLE, J.; DRESCHER, C.; NISCHT, R.; FOX, J. W.; MAUCH, C. The reprotin jararhagin, a snake venom metalloproteinase, functions as a fibrillar collagen agonist involved in fibroblast cell adhesion and signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 43, p. 40528-40535, 2002.