

MIRYAM GUILLERMINA PALOMINO RODRIGUEZ MOLINA

**Efeito *in vitro* da botropasina, uma metaloproteinase
do veneno da serpente *Bothrops jararaca*,
e de seus domínios não catalíticos sobre
eventos envolvidos na angiogênese**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia

**São Paulo
2018**

MIRYAM GUILLERMINA PALOMINO RODRIGUEZ MOLINA

**Efeito *in vitro* da botropasina, uma metaloproteinase
do veneno da serpente *Bothrops jararaca*,
e de seus domínios não catalíticos sobre
eventos envolvidos na angiogênese**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça

Versão corrigida. A versão original encontrasse disponível na Secretaria da Pós-graduação que aloja o programa de Pos-graduação.

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Palomino Rodriguez Molina, Miryam Guillermina
Efeito in vitro da botropasina, uma
metaloproteinase do veneno da serpente Bothrops
jararaca, e de seus domínios não catalíticos sobre
eventos envolvidos na angiogênese / Miryam
Guillermina Palomino Rodriguez Molina; orientador
Ronaldo Zucatelli Mendonça. -- São Paulo, 2018.
103 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Botropasina. 2. Peptídeos. 3. Angiogênese. 4.
Migração. 5. Sinalização celular. I. Zucatelli
Mendonça, Ronaldo, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidata: Miryam Guillermina Palomino Rodriguez Molina

Título da Tese: Efeito in vitro da botropasina, uma metaloproteinase do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, e de seus domínios não catalíticos sobre eventos envolvidos na angiogênese.

Orientador: Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

São Paulo, 30 de junho de 2017
CEUAx N 2758170517

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Ronaldo Zucатели Mendonça
Área: Parasitologia
Ronaldo Zucатели Mendonça (orientador)

Título do projeto: "Efeito in vitro da botropasina, uma metaloproteinase do veneno da serpente Bothrops jararaca, e de seus domínios não catalíticos sobre eventos envolvidos na angiogênese.".

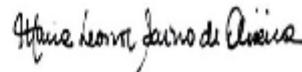
Parecer Consubstanciado da CEUA IB

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan, na reunião de 21/06/2017, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.



Jose Ricardo Jensen
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

A minha família,
a meus pais Adita e Nazario,
a meus avós Cipriana e Fortunato,
a meus filhos David, Pietro e Agnes,
e a meu esposo Alexandre, os amo!!

*Não chores meu filho;
Não chores, que a vida
É luta renhida:
Viver é lutar.
A vida é combate,
Que os fracos abate,
Que os fortes, os bravos
Só pode exaltar.*

Gonçalves Dias

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e conforto, por mostrar-me que ninguém está isolado, que nada acontece ao acaso, por ensinar-me a lutar pelo que queremos e pelos que amamos. Ao olhar 5 anos atrás, quando era só a Miryam, viveria tudo de novo, pela família que tenho agora. Foram desafios, tombos, quedas, levantes, amizades, conforto, abraços, solidariedade, angústia, amor, tudo muito intenso. O que ficou não tem preço, não é só o conhecimento, e sim fortaleza e formação de caráter para enfrentar desafios que virão. Obrigada Senhor, por dar-me a conclusão a esta etapa. Mal acredito, parecia não ter fim. Obrigada a todos que me acompanharam nesta etapa. Obrigada mesmo!!!

A meu amor, Alexandre, por ser meu companheiro que com amor, carinho e auxílio nos diversos momentos consegui desenvolver esta tese. Até o último momento estive compartilhando o cuidado de nossos pequenos, obrigada pela força e coragem!

Ao professor Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça pela sua amizade, paciência e apoio, por ter acreditado em mim para a conclusão desta tese, pelas pequenas gotas de ânimo a cada dia que motivaram a enfrentar os desafios. O orientador faz parte do dia a dia do aluno, suas palavras ou nos derrubam ou nos levantam, há coisas que vão além de 5 anos, você com suas palavras é um orientador da vida a quem agradeço de coração por ter compartilhado seu tempo comigo. NAMASTE!

A Dra. Marcella Prado, por ter aberto as portas do Laboratório Especial de Toxinologia (LETA) e confiado em mim para o desenvolvimento desta tese, e pelos bons momentos que tivemos. Por ter compartilhado a ideia que toxina é proliferativa, foi algo no qual também acreditei e decidi tomar a frente, obrigada por tudo Marcella!

Ao Dr. Osvaldo A. Sant'anna, pela força para começar este doutorado.

A Dra. Fernanda Calheta, Dra. Sandra Sampaio, Vanessa Freitas, Dra. Julia Cunha, Dr. Robson Mello, Dr. Ricardo Giordano pela colaboração, orientação e observações nos experimentos.

Ao Dr. Hugo Aguirre Armelin, Dra. Monica Lopes-Ferreira e Dra. Carolina Sabbaga, Dra. Solange Serrano, Dr. Pedro Ismael, Dr. Leo Iwai, pesquisadores do LETA, pelo uso de equipamentos e auxílio nos experimentos para o desenvolvimento desta tese.

Aos técnicos de laboratório Alexsander S. de Souza do setor de Microscopia com focal e Dr. Georgi M.C. Ferreira Junior do setor de citometria de fluxo, pelo apoio e paciência nas leituras dos experimentos.

Aos colegas do LETA por ter me recebido com carinho e apoiado naqueles momentos de crescimento familiar, não tenho como agradecer todo o apoio recebido quando precisei: Milene, Pollyanna, Ana Helena, Ana Karina e Luciana, esse time foi demais! A Cris por ter me acompanhado desde o começo até o final neste doutorado. A Simone, Rafael, Marcello, Devora, Carol, Vincent, Matheus, Marcello, Edu, Cecília, Andrea, Paula, Carol, Fabio, Frank, Zoraia, Thiago, Elisa, e todos os colegas do laboratório por suas conversas pessoais e de trabalho que ajudaram muito. Foi bom estar com vocês.

Aos Técnicos do laboratório do LETA, Dona Ligia, Rosa, Ivan e Ismael que ajudaram com a parte técnica do laboratório, facilitando nosso tempo nos experimentos e por compartilhar suas experiências, e nos dão as condições no laboratório para exercer as atividades.

Ao pessoal do laboratório de Parasitologia por ter me adotado e acompanhado no final desta tese: Arlete, Lourdinha, Tatiane, Juliana, Jade, Simone S, Mercedes, Felipe, Dra. Isabel e Fernando.

A Daniela, Alexandre e Roberto do programa de Pós-graduação da Biotecnologia, por seu apoio e orientações quando precisei muito obrigada!

A todo o pessoal do Instituto Butantan que me apoiou. Foram tantos, desculpem se me esqueci de alguém, mas todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta tese, muito obrigada!!

As funcionárias da secretaria do Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, por auxiliarem em todos os passos.

A minha família que mesmo longe, no Perú, sempre me apoio.

A minhas amigas mães da creche e da USP : Margarita, Luana, Michele, Rina, Gabi e Estela, pela solidariedade, compartilhar experiências, pelas conversas e força que nos demos.

A Universidade de São Paulo – SAS, por todo o apoio que nós estudantes temos: o restaurante universitário, Hospital Universitário, moradia no CRUSP e à creche da USP, onde muitas mães estudantes conseguem deixar os filhos sem deixar dos estudos. Instituições com essas facilidades fazem possível que muitos alunos não desistam da vida acadêmica a pesar da familiar.

Ao Instituto Butantan pela infraestrutura dos laboratórios, e pelas condições para desenvolver nossas atividades acadêmicas, Obrigada.

APOIO FINANCEIRO

A autora quer agradecer pelo apoio financeiro às diferentes instituições que permitiram o desenvolvimento deste trabalho.

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior),

FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) (2008/54192-0).

RESUMO

PALOMINO RODRIGUEZ, M. G. **Efeito *in vitro* da botropasina, uma metaloproteinase do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, e de seus domínios não catalíticos sobre eventos envolvidos na angiogênese.** 2018. 103 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Botropasina (Bt) é uma toxina isolada do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, associada a processos inflamatórios. Neste contexto da inflamação como fator desencadeante da angiogênese, verificamos se a botropasina, uma metaloproteinase isolada do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, poderia modular diretamente as transições fenotípicas do processo angiogênico. O objetivo deste trabalho foi caracterizar os efeitos da Botropasina, domínios DC e peptídeos sintéticos derivados dos domínios DC (Ca II, Ca III e HCR), sobre os eventos da angiogênese como proliferação, migração, secreção de gelatinases, tubulogênese, e os mecanismos moleculares envolvidos no sistema *in vitro* nas células endoteliais HUVEC-CS. Nossos resultados mostram que tanto as proteínas Bt e DC, e o peptídeo HCR induzem os eventos angiogênicos de proliferação, migração, secreção de MPPs e formação de túbulos em matrigel, e estes são dependentes da dose. Os peptídeos Ca II e Ca III não induziram todas as características próprias da angiogênese. A migração observada tanto nos ensaios 2D, 3D, assim como na expressão do DLL4 e as fibras de estresse do citoesqueleto, sugerem que o tratamento com botropasina e o peptídeo HCR induzem o fenótipo migratório - tip cells nas células endoteliais. A ativação da via de sinalização de Erk via integrinas, seria o mecanismo de sinalização das proteínas Bt e DC, enquanto o peptídeo linear HCR teria um mecanismo de interação direta com receptores intracelulares. O tratamento com a Bt estimula a fosforilação das proteínas Akt, Fak e p38, envolvidas na migração, sobrevivência e estresse celular, mas sem alterações na morfologia. A presença de proteínas inflamatórias como vimentina e calistatina nas formas secretada, indica que os tratamentos com as proteínas Bt e DC induzem uma resposta inflamatória nas células endoteliais, promovendo os eventos da angiogênese, enquanto o peptídeo HCR se mostra como altamente mitogênico e sem efeitos inflamatórios.

Palavras-chave: Angiogênese. Botropasina. Peptídeos. Migração. Sinalização celular.

ABSTRACT

PALOMINO RODRIGUEZ, M. G. **In vitro effect of bothropasin, an snake venom metalloproteinase from *Bothrops jararaca*, and its non-catalytic domains on events involved in angiogenesis.** 2018. 103 f. Thesis (Ph. D. thesis in Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Botrohasin (Bt) is a metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom, an associated with inflammatory processes. In the context of inflammation as a triggering factor of angiogenesis, we tested if botrohasin, could directly modulate the phenotypic transitions of the angiogenic process. The objective of this work was to characterize the effects of Botrohasin, DC domains and synthetic peptides derived from the DC domains (Ca II, Ca III and HCR), on the events of angiogenesis such as proliferation, migration, gelatinases secretion, tubulogenesis, and molecular mechanisms involved in the in vitro system in HUVEC-CS endothelial cells. Our results show that both Bt, DC proteins, and the HCR peptide induce the angiogenic events of proliferation, migration, MMP secretion and matrigel tubule formation, and these are dose dependent. Ca II and Ca III peptides did not induce all the angiogenesis characteristics. The migration observed in both the 2D and 3D assays, as well as in the expression of DLL4 and cytoskeletal stress fibers, suggests that treatment with botrohasin and the HCR peptide induce the migratory phenotype - tip cells in the endothelial cells. Activation of the Erk signaling pathway via integrins would be the signaling mechanism for Bt and DC proteins, whereas the linear peptide HCR would have a mechanism of direct interaction with intracellular receptors. Treatment with Bt stimulates the phosphorylation of Akt, Fak and p38 proteins, involved in migration, survival and cell stress, but without changes in morphology. The presence of inflammatory proteins such as secreted vimentin and kallistatin indicates that the treatments with Bt and DC proteins induce an inflammatory response in the endothelial cells, promoting the angiogenesis events, whereas the HCR peptide shows to be highly mitogenic and without inflammatory effects.

Keywords: Angiogenesis. Bothropasin. Peptides. Cell migration. Cell signaling.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Especialização funcional das células endoteliais durante o processo de angiogênese por brotamento.	20
Figura 2 - Estrutura da botropasina	24
Figura 3 - Estrutura do domínio tipo desintegrina (D).....	26
Figura 4 - Alinhamento dos domínios tipo-desintegrina e rico em cisteína da classe P-III.	31
Figura 5 - Fluxograma do desenho experimental.	34
Figura 6 - Avaliação da atividade enzimática da Bt e DC.	48
Figura 7 - Estrutura terciária dos peptídeos.....	51
Figura 8 - Sincronização do ciclo celular da linhagem HUVEC-CS.....	54
Figura 9 - Ciclo celular das células HUVEC-CS.....	55
Figura 10 - Avaliação de apoptose das HUVEC-CS.....	56
Figura 11 - Citotoxicidade - método MTT.....	58
Figura 12 - Fotomicrografia em microscopia invertida de contraste de fase, mostrando o aspecto morfológico das células tratadas com botropasina.....	59
Figura 13 - Proliferação celular – Metodo de incorporação de BrdU.	60
Figura 14 - Migração celular : Ensaio de ferida por <i>RadiusAssay</i>	63
Figura 15 - Migração celular em superfície de colágeno: <i>Well wound healing assay</i>	64-65
Figura 16 - Migração transwell em câmara de Boydem.....	67
Figura 17 - Atividade gelatinolítica por Zimografia.	68
Figura 18 - Efeito das proteínas Bt e DC na adesão das células HUVEC-CS às proteínas da matriz extracelular	70
Figura 19 - Efeito dos peptídeos na adesão das células HUVEC-CS às proteínas da matriz extra celular.	72
Figura 20 - Efeito do tratamento na formação de túbulos em cultura 3D Matrigel.	74
Figura 21 - Fotomicrografia em microscopia invertida de contraste de fase da célula HUVEC-CS em cultura 2D tratada com botropasina.....	75
Figura 22 - Expressão das proteínas Erk 1/2, Akt, Fak e P38 total e fosforilada em células HUVEC-CS tratadas com as proteínas Bt e DC	77
Figura 23 - Expressão das proteínas Erk 1/2, Akt, Fak e P38 total e fosforilada em células HUVEC-CS tratadas com o peptídeo HCR.....	78

Figura 24 - Efeito do inibidor MEK/ERK U0126 nas células HUVEC-CS tratadas com as proteínas Bt, DC e o peptídeo HCR.	79
Figura 25 - Efeito do inibidor MEK/ERK U0126 na proliferação e migração das células HUVEC-CS tratadas com Bt, DC e HCR.	80
Figura 26 - Expressão de DLL4 em células HUVEC-CS tratadas com as proteínas Bt, DC e o peptídeo HCR	81
Figura 27 - Expressão do VEGF-R2 em células tratadas com Bt e DC.....	82
Figura 28 - Expressão das integrinas $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_2\beta_1$ por citometria de fluxo.....	83
Figura 29 - Fotomicrografia em microscopia com focal de varredura a laser de células HUVEC-CS mostrando a morfologia e padrão de distribuição da integrina $\alpha_5\beta_1$	84
Figura 30 - Fotomicrografia em microscopia com focal de varredura a laser de células HUVEC-CS mostrando o padrão de distribuição da integrina $\alpha_2\beta_1$	85
Figura 31 - Ciclo celular das células HUVEC-CS tratadas com Bt, DC e HCR	86
Figura 32 - Proteínas do sobrenadante celular dos tratamentos Bt e DC separadas por SDS-PAGE e identificadas por espectrometria de massas.....	87
Figura 33 - Células HUVEC-CS tratadas com o peptídeo HCR-FITC.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Peptídeos sintetizados derivados dos domínios DC da botropasina.....	32
Tabela 2 - Anticorpos primários e secundários usados para western <i>blotting</i>	41
Tabela 3 - Propriedades preditas dos peptídeos sintéticos pelo ProtParam.....	49
Tabela 4 - Predição da atividade antiangiogênica dos peptídeos	50
Tabela 5 - Proteínas estruturalmente semelhantes ao HCR obtidas no alinhamento I-TASSER.....	52
Tabela 6 - Proteínas obtidas pelo alinhamento do HCR com a base de dados de proteínas humanas do BLAST.....	53
Tabela 7 – Proteínas no sobrenadante dos tratamentos Bt e DC identificadas por espectrometria de massas	87
Tabela 8 - Resumo dos resultados <i>in vitro</i>	89

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Resíduos de aminoácidos
BSA	Albumina do soro bovino
Bt	Botropasina
Bt-I	Botropasina inativada no domínio catalítico com EDTA
DC	Domínios tipo disintegrina e rico em cisteínas da botropasina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Ca II	Sequência de aminoácidos correspondentes aos sítios de ligação do íon Ca^{2+} no sítio Ca II do domínio tipo-disintegrina
Ca III	Sequência de aminoácidos correspondentes aos sítios de ligação do íon Ca^{2+} no sítio Ca III do domínio tipo disintegrina
CE	Célula endotelial
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
ECD	Sequência de aminoácidos: Glutamato-Cisteína- Aspartato
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	ácido aminopolicarboxílico
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
HCR	Sequência de aminoácidos correspondentes à região altamente conservada do domínio rico em cisteínas.
HUVEC-CS	Célula endotelial de cordão umbilical humano
IFI	Imunofluorescência indireta
kDa	Kilo Dalton
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinases da matriz
MTT	Corante 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
nM	Nanomolar
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato salino
RGD	Sequência de aminoácidos: Arginina- glicina- aspartato
SFB	Soro fetal bovino
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SVMP	<i>Snake venom metalloproteinases</i>
VSMC	<i>Vascular Smooth Muscle Cell</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Angiogênese	18
1.2	Integrinas	21
1.3	Metaloproteínas do veneno de serpentes (<i>Snake Venom Metalloproteinases</i> - <i>SVMPs</i>)	22
1.3.1	Botropasina	23
1.4	Célula endotelial	27
1.5	Justificativa	28
2	OBJETIVOS	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Botropasina e domínios DC	30
3.1.1	Purificação	30
3.1.2	Avaliação da atividade enzimática	30
3.2	Peptídeos	31
3.2.1	Síntese	32
3.2.2	Análise <i>in silico</i> das propriedades físicoquímicas	32
3.3	Cultura celular e condições de cultura	33
3.3.1	Sincronização da célula HUVEC-CS na fase G0/G1 do ciclo celular	33
3.3.2	Avaliação de apoptose e necrose	33
3.4	Citotoxicidade pelo método colorimétrico MTT	35
3.5	Eventos da angiogênese <i>in vitro</i>	35
3.5.1	Proliferação celular pelo método de incorporação de BrdU	36
3.5.2	Migração celular	36
3.5.2.1	Fechamento de ferida (Radius assay)	36
3.5.2.2	Fechamento de ferida em superfície de colágeno IV	37
3.5.2.3	Invasão transwell em câmara de Boydem	37
3.5.3	Atividade gelatinolítica por zimografia	38
3.5.4	Adesão celular a proteínas da Matriz extracelular (MEC)	38
3.5.5	Formação de túbulos em Matrigel	39
3.6	Expressão de proteína	39
3.6.1	Lisados Celulares	40
3.6.2	Eletroforese em SDS-PAGE e Western blotting	40
3.6.3	Inibição de MEK/ERK com U0126	42
3.6.4	Citometria de fluxo	42
3.6.5	Microscopia de fluorescência	43
3.7	Expressão de proteínas secretadas no sobrenadante celular	43
3.7.1	Coloração do gel com prata	44
3.7.2	Digestão <i>in gel</i>	44
3.7.3	Identificação da proteína por Espectrometria de massas	45
3.7.4	Análise dos dados	45
3.8	Ciclo celular	46
4	RESULTADOS	47
4.1	Atividade enzimática da botropasina e domínios DC	47
4.2	Propriedades <i>in silico</i> dos peptídeos	49
4.2.1	Propriedades físicoquímicas <i>in silico</i> dos peptídeos	49
4.2.2	Atividade anti-angiogênica	50
4.2.3	Estrutura dos peptídeos	50

4.2.4	Alinhamento dos peptídeos no programa BLAST.....	51
4.2.5	Análise in sílico do peptídeo HCR	52
4.3	Células HUVEC-CS	54
4.3.1	Sincronização celular na fase G0/G1	54
4.3.2	Ciclo celular das células endoteliais sincronizadas	55
4.3.3	Avaliação da apoptose e necrose	56
4.4	Citotoxicidade das proteínas botropasina, DC e peptídeos Ca II, Ca III e HCR nas células HUVEC-CS e SVMC pelo método MTT	57
4.5	Eventos da angiogênese in vitro em resposta aos tratamentos com as proteínas botropasina, DC, e os peptídeos Ca II, Ca III e HCR	60
4.5.1	Proliferação celular	60
4.5.2	Migração celular	62
4.5.2.3	Invasão transwell em câmara de Boydem	66
4.5.3	Secreção de Metaloproteinas da Matriz (MMPs) gelatinolíticas	68
4.5.4	Adesão celular a proteínas da matriz extracelular	69
4.5.5	Formação de túbulos em Matrigel	73
4.6	Vias de sinalização	76
4.6.1	Via das MAPKinasas	76
4.6.2	Efeito da inibição do MEK/ERK U0126	79
4.6.3	Expressão de DLL4 da via de sinalização de Noth	81
4.6.4	Expressão do receptor 2 VEGF	82
4.7	Expressão de integrinas	83
4.8	Análise do ciclo celular	86
4.9	Expressão de proteínas secretadas em resposta aos tratamentos com as proteínas Bt e DC e identificadas por espectrometria de massas	87
4.10	Peptídeo HCR-FITC ingressa na célula HUVEC-CS	88
5	DISCUSSÃO.....	90
6	CONCLUSÃO.....	99
	REFERÊNCIAS*	100

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, há um aumento progressivo na incidência de doenças originadas ou associadas à angiogênese, sendo a aplicação clínica dividida em terapias anti-angiogênicas e pró-angiogênicas. A terapia anti-angiogênica tem sido amplamente estudada após Judah Folkman publicar que os tumores geram pequenos vasos sanguíneos para nutrir-se, (FOLKMAN; HAUDENSCHILD; ZETTER, 1979) iniciando a área de pesquisa no câncer chamada de terapia anti-angiogênica na busca de inibidores angiogênicos. Por outro lado, o aumento progressivo da incidência de doenças relacionadas com diminuição ou falta de angiogênese, como doença arterial obstrutiva periférica, doenças cardiovasculares, degeneração macular, reparação de feridas, tratamento de úlceras crônicas como o pé diabético e outras desordens isquêmicas, aumentam as pesquisas em terapias pro-angiogênicas, que procuram novos compostos que estimulam a vascularização e compreensão de seus mecanismos (BRANDÃO; COSTA; MANSILHA, 2012; FERRARA; KERBEL, 2005).

Os venenos de serpente são uma rica fonte de moléculas com potencial terapêutico como proteínas, enzimas e peptídeos, as quais apresentam potencial uso como agentes terapêuticos em várias patologias (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2017; PAL et al., 2002; SARRAY et al., 2013; VYAS et al., 2013). Os componentes ativos do veneno interagem com as moléculas de adesão localizadas na superfície celular, estabelecendo interações fundamentais para diversos processos biológicos (SONG et al., 2012) e dependendo sua concentração possuem atividade proteolítica sobre os componentes da matriz extracelular e a membrana basal dos vasos sanguíneos (RAMOS et al., 2007; VYAS et al., 2013), atividade requerida para indução de angiogênese. No entanto, o uso na terapia requer quantidades suficientes que permitam ensaios biomédicos, pelo que foram desenvolvidas diversas estratégias de produção, como os peptídeos sintéticos desenhados em base à estrutura nativa de moléculas ou modificados na sua estrutura melhorando sua eficiência. Peptídeos derivados de componentes do veneno de *Bothrops jararaca* têm sido satisfatoriamente utilizados em diferentes fases de tratamento, e até aprovadas pela FDA, como são o hipertensivo captopril (modelada da estrutura de *Bothrops jararacusa*) e o anticoagulante Eptifibatide (derivada da proteína de cobra americana *Sistrurus miliarius barbouri*)(SARRAY et al., 2013).

A angiogênese e a inflamação são dois processos estreitamente relacionados, isto inclui a formação de novos vasos sanguíneos em tecido de granulação com efeitos pró-inflamatórios e pró-angiogênicos. Neste contexto da inflamação como fator desencadeante da angiogênese, nós verificamos que a botropasina modula cada uma das transições fenotípicas do processo

angiogênico, como a proliferação, migração, e conseqüentemente sintetizamos peptídeos contendo seqüências conservadas correspondentes aos domínios DC da botropasina, com a finalidade de determinar se estas seqüências são as responsáveis pelos efeitos observados com a proteína total ou são propriedades só dos domínios DC.

1.1 Angiogênese

Desde a etapa embrionária até nossa vida adulta estamos em continua formação e remodelação dos vasos sanguíneos (artérias, arteríolas, vênulas, veias e capilares) que se ramificam por todo o organismo por donde circula a sangue que transporta oxigênio e nutrientes a todas as células de nosso corpo. O desenvolvimento dos vasos sanguíneos ocorre por dois processos fundamentais: vasculogênese e angiogênese.

A vasculogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de células precursoras não diferenciadas do mesodermo (angioblastos) que migram e se diferenciam em resposta a estímulo local, formando uma rede vascular primitiva, nomeada plexo vascular primário. Estas células progenitoras vão se originar os vasos sanguíneos (DEMIR ET AL., 2010). A extensão e modificação desta rede vascular origina um sistema vascular maduro, mais complexo constituído por vasos de calibre maior, a partir do qual novos brotos capilares podem germinar. Este processo é denominado angiogênese, que é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de células endoteliais (CE) diferenciadas de um vaso pré-existente (DRAKE, 2003). A vasculogênese e angiogênese acontecem tanto no desenvolvimento embrionário como no adulto, a vasculogênese no adulto está associado a algumas situações patológicas, como no processo de isquemia, onde os angioblastos provenientes do sangue periférico e medula óssea são recrutados formando os novos vasos sanguíneos (AHN et al., 2009).

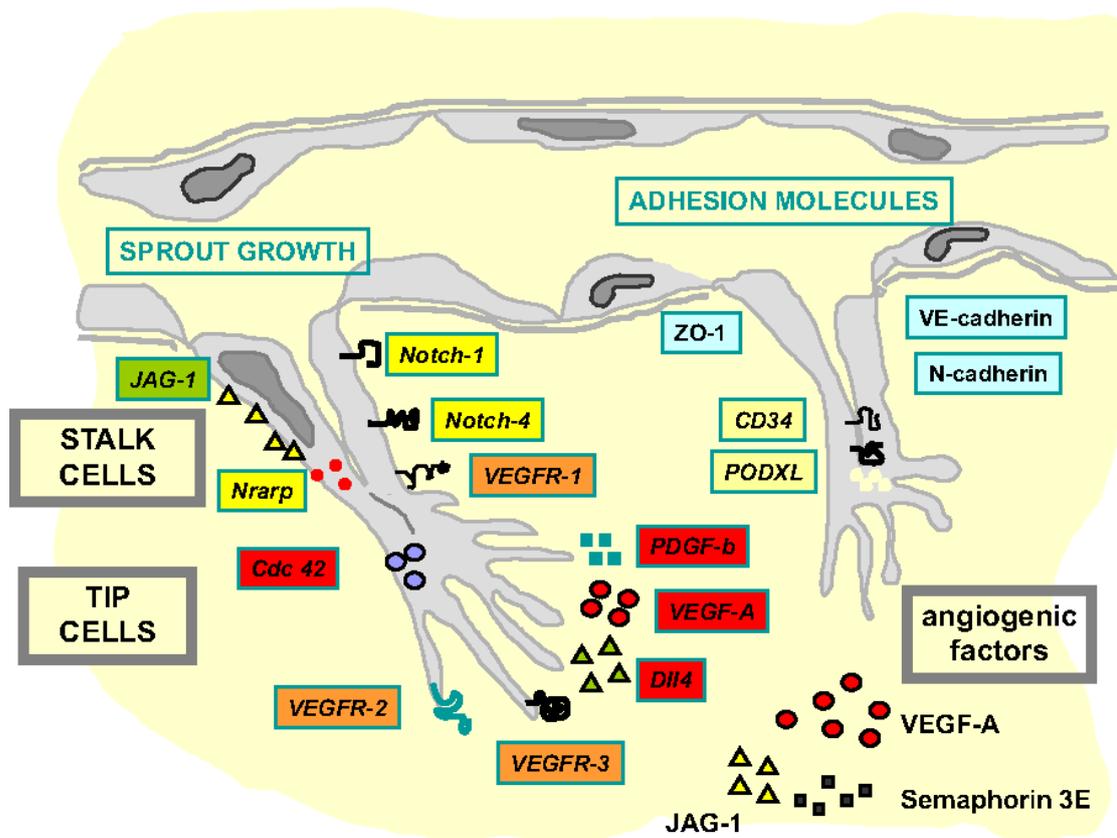
Embora os capilares sejam um tipo de tecido universalmente presente em nosso corpo, são estes formados por células endoteliais que podem ser consideradas entre aquelas que apresentam um baixo ritmo de divisões celulares entre as demais células do corpo. Na ausência de um estímulo pró-angiogênico, as células endoteliais podem existir por anos em estado quiescente (não proliferativas) até que sinais liberados pelo microambiente estimulam as células endoteliais a se proliferarem.

A angiogênese por brotamento (*Sprouting angiogenesis*) é um processo de múltiplos estágios, incluindo: ativação de células endoteliais (CE), crescimento e orientação de brotos, fusão dos brotos e formação do lúmen, perfusão e maturação das células endoteliais. Estes estágios podem separá-los em duas fases: fase de indução e fase de resolução.

Na fase de indução (a), o estímulo por fatores de crescimento, angiopoietinas, e fatores induzidos por hipóxia, ativam as células endoteliais, apresentando permeabilidade celular, com extravasamento de componentes do plasma para o espaço subendotelial, esta ativação implica alteração dos produtos de secreção a fim de degradar a membrana basal e de modular a composição da matriz extracelular (MEC). As moléculas responsáveis por iniciar o estímulo angiogênico são: o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF-A), receptores VEGF, e receptores da sinalização de Notch. A exposição das CE a gradientes de uma ou outra destas moléculas vai determinar a especialização funcional ou fenotipo da célula endotelial durante as diferentes fases do processo: células de ponta (*tip cells*) ou células do tronco (*stalk cells*) com diferenças morfológicas e propriedades funcionais (Figura 1). Células *tip cells* são expostas a maiores concentrações de VEGF-A, direcionando a formação dos brotos angiogênicos, enquanto que as células *stalk cells* são menos migratórias e mais proliferativas permitindo a expansão destes brotos angiogênicos. (RIBATTI; CRIVELLATO, 2012), DURAN et al., 2018). Na fase de resolução (b) há diminuição do fenótipo proliferativo e invasivo, com formação de redes, remodelação, poda, levando à anastomose, formação de vacúolos nas células formam o lúmen do novo vaso sanguíneo, maturação e estabilização final do vaso, e finalmente as células endoteliais voltam ao estado quiescente. As junções entre as células adjacentes são estabelecidas com aderência à MEC e inibição da degradação, os pericitos e outras células murais são recrutadas e a membrana basal é formada, com formação de uma alça capilar e diferenciação de novos vasos e redes de capilares (IRVIN et al., 2014; PEIRCE; GABHANN; BAUTCH, 2012).

Angiogênese é um processo finamente regulado pelo balanço entre moléculas pro- e anti angiogênicas. Entre os fatores angiogênicos mais estudados está o VEGF, entre estas temos a famílias do VEGF-A (isoformas VEGF-A121, VEGF-A165, VEGF-A189, VEGF-A206), VEGF-B, -C, e -D. Outros fatores de crescimento como o FGF, HIF (Hipoxia inducível fator), PDGF, quimoquinas e moléculas que atuam estimulando uma variedade de vias de segundos mensageiros e kinases que promovem a proliferação, câmbios no citoesqueleto e migração celular (DURAN ET AL., 2018). A desregulação deste balanço é o ponto de partida para mais de 50 doenças diferentes (câncer, retinopatia diabética, Alzheimer, artrites, e outras doenças isquêmicas e inflamatórias), sendo o câncer uma das doenças com aumento na incidência e mortalidade (BISHT; DHASMANA; BIST, 2010; CARMELIET, 2003; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015).

Figura 1 - Especialização funcional das células endoteliais durante o processo de angiogênese por brotamento



A especialização funcional de células endoteliais durante o processo de brotação. O VEGF-A induz a formação e extensão de filopódios e a expressão da proteína Dll4 nas células da ponta (*Tip cells*). As *tip cells* expressam altos níveis de DLL-4, PDGF-b, UNC5b, VEGFR-2 e VEGFR-3 / Flt-4. As células do tronco (Stalk cells) produzem menos filopódios, são mais proliferativas, formam ramificações tubulares com um lúmen vascular. Fonte: Ribatti e Crivellato (2012).

Em consequência da complexa regulação do processo angiogênico, defeitos no sistema de regulação da angiogênese, onde o corpo não consegue eliminar ou gerar vasos no local e momento correto, tem levado uma série de doenças dependentes de angiogênese, como a artrite reumatoide, psoríase, retinopatia diabética, isquemia, câncer, entre outras (CARMELIET, 2003).

1.2 Integrinas

As integrinas são os mais importantes receptores de superfície celular capazes de mediar a adesão celular e sinalização entre a MEC e o citoesqueleto de actina, sinalizando em ambas as direções da membrana celular (HUTTENLOCHER; HORWITZ, 2011). As integrinas são glicoproteínas heterodiméricas, que apresentam as subunidades α e β associadas de forma não covalente, com diferentes combinações de $\alpha\beta$, sendo descritas pelo menos 18 subunidades α e 8 subunidades β , com 24 diferentes combinações entre elas (MALININ; PLUSKOTA; BYZOVA, 2012). A combinação das subunidades α e β confere a especificidade de união a um ou mais substratos (HUMPHRIES et al., 2006), determinando se a célula vai aderir e sobreviver em um microambiente particular. A combinação integrina-ligante tem uma função crítica na regulação da capacidade das células endoteliais formarem novos brotos angiogênicos, localização das células inflamatórias recrutadas nos sítios de reparo, ou na potencial invasividade das células tumorais (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010). As integrinas se unem diretamente a numerosos receptores de fatores de crescimento. O complexo $\alpha_v\beta_3$ e VEGFR2 sinaliza para promover angiogênese induzida pela MEC ou ligantes que se unem ao fator de crescimento, $\alpha_v\beta_3$ forma um complexo com o receptor de angiopoietina Tie-2 ampliando a cascata angiogênica. Em contraste, a expressão de $\alpha_2\beta_1$ aumenta a expressão de VEGFR1, que atua em oposição aos sinais pró-angiogênicos do VEGFR2 (ZHANG, et al., 2008). Normalmente a união da integrina à MEC promove adesão e sobrevivência pela ativação das vias de sinalização. No entanto, a união de integrinas a fatores de crescimento ou aos seus receptores, altera provavelmente o balanço das vias de sinalização dos diferentes tipos celulares envolvidos na angiogênese (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010).

As integrinas se ligam as sequências RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) que se encontram distribuídas em uma grande variedade de proteínas de adesão da MEC (fibronectina, vitronectina, colágeno, fibrinogênio, trombospondina, e fator de von Willebrand). No contexto da angiogênese, proteínas de venenos de serpente contendo a sequência RGD tem mostrado ligação seletiva a receptores integrinas da superfície celular endotelial, inibindo a angiogênese (WALSH; MARCINKIEWICZ, 2011). As toxinas podem sinalizar para induzir a reorganização do citoesqueleto, a expressão de novos tipos de moléculas de adesão e alterações do complexo de adesão focal, representando uma promissora área de investigação (CALVETE et al., 2005; GALLAGHER et al., 2005b; KAMIGUTI; HAY; ZUZEL, 1996). Da mesma forma, peptídeos sintéticos contendo a sequência RGD podem mimetizar os ligantes da MEC, alterando a sinalização celular mediada pelas integrinas (WEIS; CHERESH, 2011).

1.3 Metaloproteínas do veneno de serpentes (*Snake Venom Metalloproteinases - SVMPs*)

As SVMPs são enzimas zinco dependentes envolvidas na interação com componentes do plasma, componentes da MEC e integrinas (FOX; SERRANO, 2008). A estrutura é constituída por uma sequência sinal, um pró-domínio (processado após a ativação da proteína) e os domínios metaloproteínase, tipo-disintegrina, rico em cisteínas, EGF-like. Baseados na composição de seus domínios, as SVMPs estão classificadas em três classes: P-I, P-II e P-III. A proteína madura da classe PI contém somente o domínio catalítico ou metaloproteínase (M); a classe P-II contém o domínio M seguido pelo domínio disintegrina; e a classe P-III contém os domínios M, disintegrina/disintegrina-like (D) e o domínio rico em cisteínas/lectin like tipo-C (FOX; SERRANO, 2005, 2008).

As SVMPs das classes PII e PIII possuem um domínio disintegrina, sendo capazes de se ligar às integrinas e inibindo sua atividade, tendo sido amplamente estudadas com esse intuito. As SVMPs – PII se ligam às integrinas através do motivo RGD que se encontra no domínio disintegrina. SVMPs - PIII apresentam o motivo ECD ao invés de RGD como ligante das integrina, mas também contém os domínios DC. Os domínios tipo disintegrina e DC das ADAM e ADAMTS, assim como das SVMPs estão envolvidos nas interações com ligantes específicos (FOX; SERRANO, 2009), sendo capazes de interagir com integrinas inibindo adesão celular e agregação plaquetária (Fox e Serrano, 2009). Contudo não se sabe qual região dessas moléculas está envolvida na ligação às integrinas, sendo que duas regiões são apontadas como prováveis responsáveis pela interação integrina-ligante, como o motivo ECD e uma região denominada região hiper variável (HVR) presente em algumas SVMPs da classe PIII.

A maioria dos estudos com proteínas de venenos de serpente tem sido realizada com a finalidade de combater os efeitos do envenenamento e desvendar os mecanismos de ação envolvidos (GALLAGHER et al., 2005a; GUTIERREZ; RUCAVADO; GUTIÉRREZ, 2000; KAMIGUTI et al., 1997), efeitos na hemostasia (LOPES et al., 2012a; TANJONI et al., 2005a, 2005b) efeitos antitumorais *in vitro* e *in vivo* (CORREA et al., 2002; MARIA et al., 2014; MARKLAND; SWENSON; JR, 2013), mas são poucos os estudos realizados em baixas concentrações das toxinas com finalidade angiogênicas (COSTA et al., 2008; SANT'ANA et al., 2008; SELISTRE-DE-ARAUJO et al., 2005).

Estudos com proteínas recombinantes constituídas pelos domínios D e C das SVMPs têm sido realizados com a finalidade de desvendar os sítios de ligação com as proteínas da MEC (OLIVEIRA et al., 2009). O estudo com os domínios DC recombinante da Bt mostrou que

motivo ECD do domínio tipo-disintegrina da botropasina, não está envolvido na ligação com a integrina. Os ensaios de inibição da adesão de células de adenocarcinoma da mama (MDA-MB-231) ao colágeno mostraram que não houve inibição da adesão celular sugerindo que, assim como outras PIII, os domínios DC da botropasina possam interagir com a subunidade α_2 da integrina, que não estavam expressas nas células testadas (PAES LEME et al., 2011).

1.3.1 Botropasina

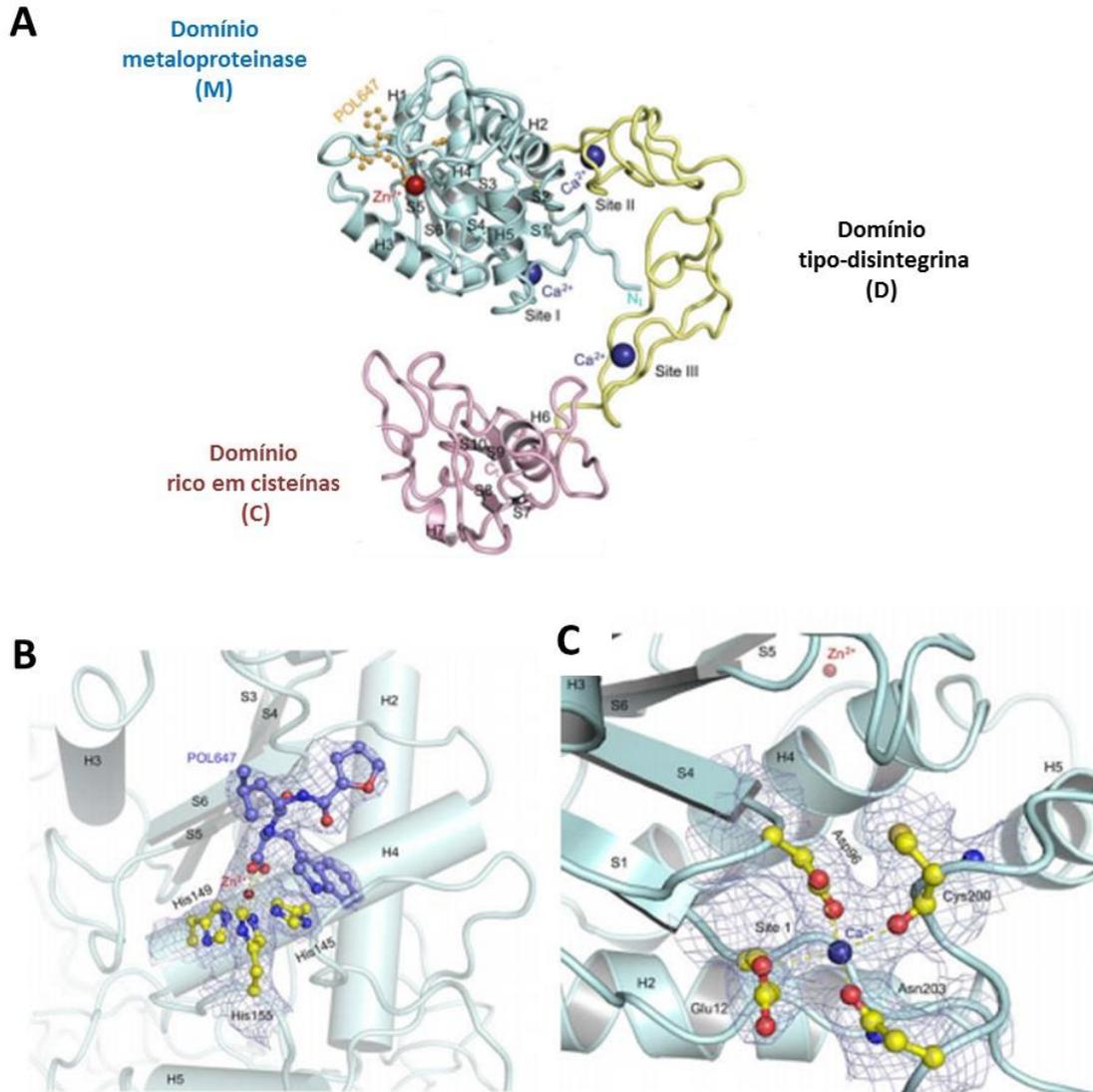
A botropasina é uma metaloproteinase de 48 kDa isolada do veneno da serpente *Bothrops jararaca* (MANDELBAUM; REICHEL; ASSAKURA, 1982b) e pertence à classe P-III da subfamília reprotlisina das metaloproteinases dependentes de zinco (FOX e SERRANO, 2005). A botropasina é composta pela sequência de 421 aminoácidos determinada através da resolução da estrutura da proteína completa, nos quais se encontram o domínio catalítico ou metaloproteinase - M (resíduos 1-208), domínio tipo disintegrina - D (resíduos 209-301) e domínio rico em cisteínas C (resíduos 302-421) como mostrado na figura 2A (MUNIZ et al., 2008).

A botropasina compartilha 95% de homologia com a jararagina, proteína também isolada de *B. jararaca*, conseqüentemente possuem ponto isoelétrico, massa molecular e atividade enzimática parecidas, sendo chamadas de isoformas. A similaridade entre estas proteínas sugere que provavelmente compartilham as mesmas propriedades e atividade biológica (MUNIZ et al., 2008b). A jararagina tem sido amplamente estudada pelos seus efeitos na hemostasia, por estar diretamente implicada na hemorragia local, edema, necrose (PAINÉ et al., 1992b) (PAINÉ et al., 1992a) e à forte atividade pró-inflamatória (COSTA ET AL. 2002; LAING AND MOURA-DA-SILVA 2005), com acumulação de leucócitos e macrófagos no local da injeção.

Domínio catalítico ou metaloproteinase (M): O domínio metaloproteinase da botropasina é caracterizado principalmente pela presença de alças e estruturas secundárias (6 folhas- β e 5 α -hélices), o sítio de ligação ao Zn^{2+} que é o sítio ativo, e o sítio de ligação ao íon Ca^{2+} denominado sítio I, coordenado pelos resíduos Glu12, Asn203, Asp96, Cys200, localizado ao lado oposto do sítio ativo e está relacionado com a estabilização da folha beta (Figura 2B, 2C). O domínio catalítico contém 7 resíduos de cisteínas, dos quais 6 deles realizam pontes dissulfeto, enquanto que o resíduo livre Cys189 é circundado por resíduos hidrofóbicos

e impedido de qualquer possibilidade de interação com outras moléculas ou domínios, não sendo responsável por interações do domínio catalítico. (MUNIZ et al., 2007).

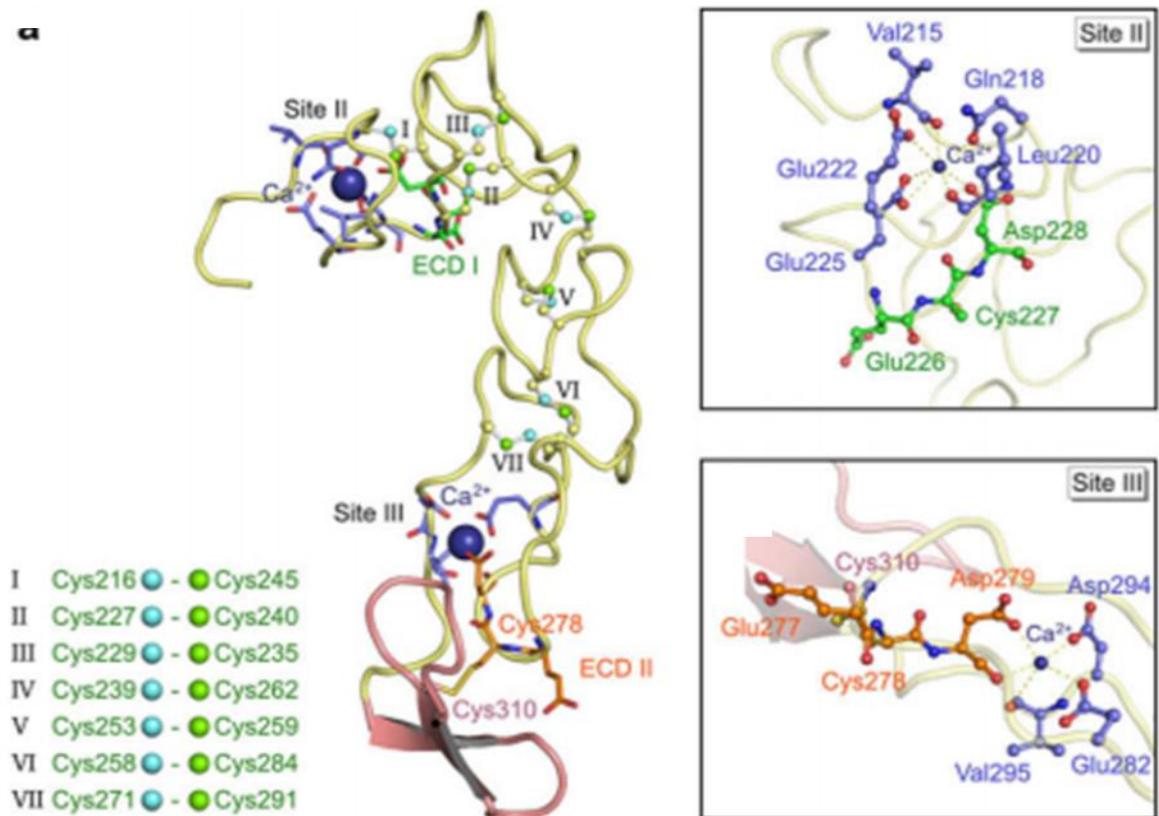
Figura 2 - Estrutura da botropasina



(A) Estrutura da botropasina: domínios metaloproteinase - M, domínio tipo-disintegrina- D e o domínio rico em cisteínas - C. (B) O domínio catalítico mostrando os sítios de ligação ao Zn^{2+} e o sítio de união ao Ca^{2+} . Adaptado de: Muniz et al., 2008.

O Domínio tipo-disintegrina (D): Não apresenta estruturas secundárias bem definidas, sendo constituído majoritariamente por alças estabilizados por 7 pontes dissulfeto e por dois sítios de ligação à Ca^{2+} (sítio II e III). Como mostrado na figura 3, o Ca^{2+} no sítio II está localizado no início do domínio D, está coordenado por átomos de oxigênio presentes nos resíduos altamente conservados Val²¹⁵, Leu²²⁰, Glu²²² e Asp²²⁸. O resíduo Asp 228 faz parte do primeiro motivo ECD, que é altamente conservado, indicando que o íon Ca^{2+} é necessário para assegurar a função da disintegrina. Dois motivos ECD também se encontram no domínio D, interessante um motivo ECD é encontrado em cada um dos sítios de coordenação do cálcio. O primeiro motivo ECD é altamente conservado na classe PIII e suas funções ainda não foram determinadas; o segundo motivo ECD tem sido demonstrado estar envolvido na ligação às integrinas, disparando uma resposta de sinalização celular (JIA et al., 1997; KAMIGUTI et al., 1999; MARIANO-OLIVEIRA et al., 2003). Disintegrinas contendo o motivo ECD podem estar envolvidas na interação à integrina $\alpha_2\beta_1$ competindo com o colágeno I para a adesão às células endoteliais e fibroblastos (TANJONI et al., 2005; ZIGRINO et al., 2001, 2002). A ponte dissulfeto Cys278 e Cys310 existente entre os domínios DC permite a liberação intacta dos domínios DC durante a autólise da botropasina, enquanto que o domínio metaloproteinase é clivado em diferentes sítios (ASSAKURA et al., 2003).

Figura 3 - Estrutura do domínio tipo-disintegrina



(A) O domínio tipo disintegrina - D. O íon Ca^{2+} , representado pela esfera azul, coordena alguns resíduos (azul) e as pontes dissulfeto (verde). O número de pontes dissulfeto são mostrados na parte inferior esquerda. As alças disintegrina ECD I (verde) e ECD II (laranja). O começo do domínio rico em cisteínas (C) em cor rosa. Detalhes representando os resíduos com os átomos de oxigênio envolvidos na coordenação dos íons cálcio no sítio II (B) e sítio III (C) do íon Cálcio.

Adaptado de: Muniz et al., 2008

O domínio rico em cisteínas (C): Apesar do nome, o domínio C apresenta menor número de cisteínas que o domínio D, sendo formado por duas hélices alfa, 4 pequenas fitas beta e “loops” que são estabilizados por 6 pontes dissulfeto. Nestes “loops” encontra-se a Região Hiper Conservada (HCR). O domínio C não se encontra naturalmente isolado no veneno, pelo que o estudo de sua função tem sido determinado por proteínas recombinantes da mesma classe PIII, mostrando funções como o rolamento de leucócitos (domínio C de HF3, toxina da classe P-III de *Bothrops jararaca*) (MENEZES et al., 2008). No domínio C da catrocolastatina, uma metaloproteinase isolada do veneno de *Crotalus atrox*, o loop é denotado como Região Hiper Variable (HVR-*Hiper Variable Region*) é uma região não tão importante para a atividade da proteína pelo reconhecimento/especificidade dos ligantes (TAKEDA et al., 2006). A análise comparativa de 41 sequências de aminoácidos de proteínas da classe P-III de SVMPs mostrou que a HVR não é encontrada em todas as proteínas, observando-se que as proteínas podem ser

divididas em dois grandes subgrupos, o constituído por proteínas PIII-HVR e o grupo de proteínas que apresentam esta região altamente conservada (HCR – *Highly Conservated Region*). A botropasina e outras 8 proteínas homólogas da classe PIII apresentam a região HVR (resíduos 373-394) altamente conservada, agrupando-se no subgrupo HCR (TAKEDA et al., 2006; MUNIZ et al., 2008).

O alinhamento das sequências da botropasina e jararagina mostra que ambas as toxinas compartilham 95% de identidade, diferenciando-se em 19 resíduos, os quais são substituições conservativas no domínio catalítico. Ambas as toxinas isoladas do veneno de *B. jararaca* possuem ponto isoelétrico, massa molecular e atividade enzimáticas muito parecidos, sendo chamadas de isoformas, sendo que a purificação de uma destas isoformas pode representar uma mistura de ambas ou incluir outras homólogas. Além disso, a similaridade entre estas duas proteínas sugere que provavelmente estas isoformas compartilham as mesmas propriedades e atividade biológica (MUNIZ et al., 2008).

1.4 Célula endotelial

O modelo *in vitro* mais usado para o estudo da angiogênese são as células endoteliais, foco central do processo angiogênico, sendo a HUVEC (*Human Umbilical Vascular Endothelial Cordon*) a célula endotelial mais amplamente usada, com várias linhagens disponíveis comercialmente. Entre as linhagens derivadas da HUVEC mais comumente usadas na pesquisa *in vitro* estão HUVEC CRL 2873 (espontaneamente transformada) e HUVEC CRL 2922 (hibridoma obtido da fusão da célula endotelial com a linhagem de célula de tumor de pulmão A549).

A linhagem CRL 2873, denominada HUVEC-CS, mantém as características de uma célula endotelial primária no nível de mitogênese, ativação de quinases, produção do óxido nítrico, expressão de marcadores de superfície (CD-31, VE-caderina) e secreção de fatores de crescimento/citocinas em resposta a estímulos pró-inflamatórios (GIFFORD et al., 2004), pelo que foi utilizada no presente trabalho.

1.5 Justificativa

A angiogênese é um processo essencial em muitas doenças, por tanto a busca de substâncias que possam modular o aumento a diminuição dos vasos sanguíneos, assim como o conhecimento dos mecanismos envolvidos é de suma importância. Entre os mecanismos que induzem a angiogênese temos a hipóxia, óxido nítrico e inflamação. A inflamação resultante de injúria local ou estímulo sistêmico incrementa a permeabilidade vascular e induz ativação das células endoteliais, a qual quando é persistente resulta em brotamento de capilares (ARROYO et al., 2010).

No contexto da inflamação como fator desencadeante da angiogênese, pareceu-nos pertinente verificar se a botropasina, uma SVMP de classe III oriunda do veneno de *Bothrops jararaca*, poderia modular diretamente cada uma das transições fenotípicas moduladas durante o processo, i.e., permeabilidade celular, proliferação, migração, adesão e morte programada. Dado que a botropasina é frequentemente encontrada no veneno sob forma de seus domínios isolados (porção catalítica isolada dos domínios DC), procuramos caracterizar as atividades regulatórias da enzima ativa, quimicamente inativada e de seu domínio DC isolado sobre a migração e proliferação de células endoteliais.

A literatura tem relatado que o domínio DC das toxinas HF3 e atrolisina-C, isoladas de *B. jararaca* e de *B. alternatus* (SVMP-PIII), apresentam regiões adesivas e regulatórias, (MENEZES et al., 2008; RAMOS et al., 2007), e tem mostrado que uma mesma toxina pode apresentar atividade anti- e pró- angiogênica dependendo da concentração usada (RAMOS et al., 2007). Baseados nestes dados, e pelos resultados obtidos, nos pareceu pertinente sintetizar peptídeos correspondentes aos domínios DC da botropasina: Ca II e Ca III correspondentes ao domínio disintegrina, e HCR correspondente ao domínio rico em cisteínas. Estes peptídeos cripticos foram selecionados após o alinhamento e a análise comparativa da sequência de aminoácidos do domínio DC das proteínas das SVMP da classe PIII (MUNIZ et al., 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar a ação da botropasina, domínios isolados DC e peptídeos derivados da sequência dos domínios DC sobre os eventos celulares da angiogênese *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar a Botropasina e seus domínios DC, verificando sua atividade enzimática.
- Sintetizar os peptídeos Ca II, Ca III e HCR a partir da sequência de aminoácidos dos domínios DC.
- Padronizar as condições de crescimento da linhagem celular HUVEC-CS para sincronizar as células na fase G0/G1 do ciclo celular, estabelecendo o tempo de 1 ciclo celular e a fase S.
- Avaliar a citotoxicidade das proteínas (Botropasina e domínios DC) e peptídeos (Ca II, Ca III e HCR) em ampla faixa de concentrações nas linhagens celulares HUVEC-CS e SVMC.
- Caracterizar a ação das proteínas e peptídeos, em diferentes concentrações, sobre os eventos de proliferação, migração, tubulogênese, secreção de MMPs e adesão celular da linhagem HUVEC-CS.
- Caracterizar o mecanismo molecular de ação das proteínas botropasina e DC e do peptídeo HCR, com destaque para dependência de integrinas específicas e vias de transdução de sinal ativada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Botropasina e domínios DC

3.1.1 Purificação

A botropasina (Bt) e os domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas (DC) gerada pela autólise de metaloproteinases, foram purificados a partir do veneno da serpente *Bothrops jararaca* seguindo o procedimento já descrito (OLIVEIRA et al. 2009). As proteínas Bt e DC foram quantificadas pelo método Bradford (1976) usando como controle a curva de BSA e leituras de absorbância a 595 nm. A pureza da proteína foi determinada por SDS-PAGE em condições redutoras (LAEMLI ET. AL., 1970) observando-se uma banda aproximada de 50 kDa para Bt e 28 kDa para DC.

3.1.2 Avaliação da atividade enzimática

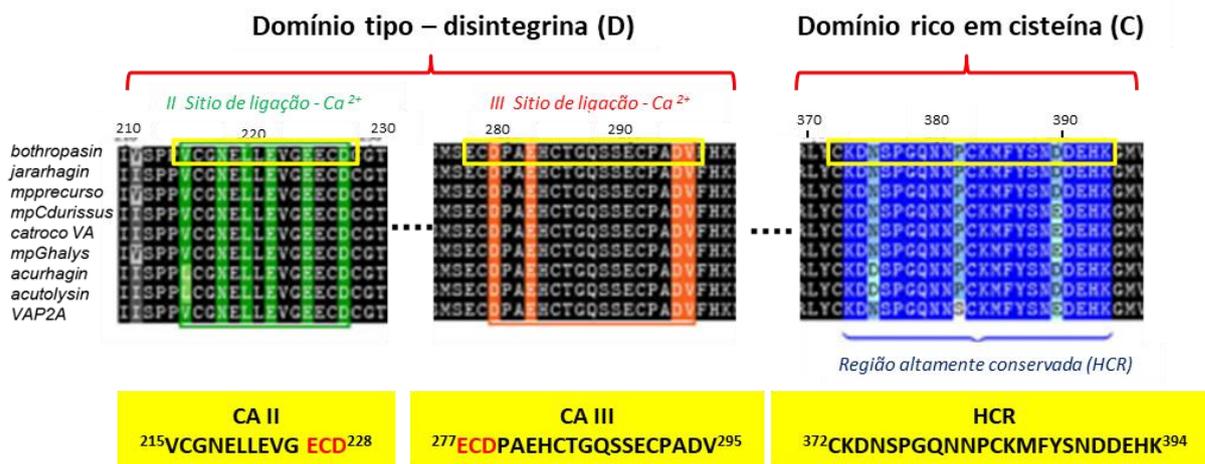
A atividade enzimática da Bt foi avaliada pela digestão do substrato fibrinogênio. Foram incubados a Bt e o fibrinogênio na proporção enzima: substrato 1: 50 (400 ng de Bt + 20 µg de fibrinogênio) em tampão Tris HCl 80 mM, pH 7,4 e CaCl 1 mM a 37 °C por 4 h. Nos controles foi adicionado água ao invés da enzima ou substrato. Os produtos da digestão foram separados em SDS-PAGE 10% e corados com prata.

As atividades hidrolíticas das proteínas Bt e DC foram avaliadas pela clivagem do substrato peptídico fluorescente FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*). A reação foi realizada com 0,05 – 0,1 µg de proteína e 5 µM de substrato FRET em volume final de 100 µL em tampão (Tris HCl 80 mM, pH 7,4 e CaCl 1 mM), sob agitação constante a 37 °C, sendo monitorada durante 15 minutos pela leitura em fluorímetro Victor 3TM nos comprimentos de onda de 420 nm de emissão, e 320 nm de excitação. A atividade específica foi expressa como unidade de fluorescência livre de substrato clivado por minuto por µg de protease (UF/min/µg). A incubação do tampão com o substrato foi utilizada como controle negativo. Os resultados foram analisados utilizando o programa GraFit.

3.2 Peptídeos

A seleção da sequência dos peptídeos foi baseada na conservação dos resíduos encontrada no alinhamento e na análise da estrutura primária dos domínios DC de proteínas da classe P-III das SVMPs realizada por Muniz e colaboradores 2008. Na figura 4, o alinhamento dos domínios tipo-disintegrina (D) e rico em cisteínas (C) de oito proteínas homólogas a botropasina mostram o alto grau de conservação dos resíduos envolvidos na coordenação dos íons Ca^{2+} (Sítio II e III de ligação ao Ca^{2+}) no domínio D e a presença de resíduos altamente conservados (*High Conserved Region* - HCR) na região da sequência do domínio rico em cisteínas (MUNIZ et al., 2008a). Estes resíduos conservados na coordenação do Ca^{2+} indicam que os dois íons Ca^{2+} são necessários para assegurar a função e/ou estrutura do domínio tipo-disintegrina; além disso, a sequência ECD (Asp-Gly-Cys) encontrada nos resíduos conservados foi considerada na síntese da sequência dos peptídeos Ca II e Ca III por serem regiões funcionais das disintegrinas ao interagir com as integrinas (Moura da Silva et al., 1999; Muniz et al., 2008). A presença de um -OH no final da sequência primária foi considerada na síntese dos peptídeos deixando a porção C-terminal na forma de ácido livre. Os peptídeos foram nomeados segundo a origem da sequência: Ca II, Ca III e HCR.

Figura 4 - Alinhamento dos domínios tipo-desintegrina e rico em cisteína da classe P- III.



Alinhamento das sequências dos domínios tipo-disintegrina e rico em cisteína da botropasina com 8 proteínas homólogas mostrando as sequências conservadas no domínio tipo disintegrina (região de coordenação dos íons Cálcio, verde e laranja) e altamente conservada (azul) do domínio rico em cisteína (Muniz et al., 2008). Baseados nestas sequências foram selecionadas as sequências na caixa amarela para a síntese de peptídeos derivados dos domínios DC da botropasina.

Adaptado de Muniz *et al.*, 2008.

3.2.1 Síntese

O procedimento de síntese de peptídeo foi realizado no laboratório de síntese de peptídeo /LETA do Instituto Butantan.

Os peptídeos nomeados como Ca II, Ca III e HCR (segundo a origem nos domínios DC da botropasina) foram produzidos pela metodologia de síntese peptídica em fase sólida (Bruce Merrifield 1963) utilizando a estratégia Fmoc (9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonil) (Atherton 1989) de proteção do grupo amino e o sintetizador PSSM-8, Shimadzu Co. (Nakagyo-ku, KY, Japão). Os peptídeos brutos foram identificados por espectrometria de massas MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*) em um espectrômetro Ettan MALDI-ToF/Pro (GE Healthcare) e purificados por cromatografia de fase-reversa em coluna C18 (HPLC), sendo reunidas as frações com teor de pureza acima de 97,5%. A identidade do peptídeo novamente analisada por espectrometria de massas e HPLC analítico. Os peptídeos foram liofilizados e estocados a -20 °C. Previamente aos tratamentos, os peptídeos foram ressuspensos em água mili-Q, aliqüotados, e as concentrações foram determinadas pelo método fluorimétrico de fluorescamina (SARIC; GRAEF; GOLDBERG, 2004) usando como controle o peptídeo 5A (LLTLR TKL) de concentração conhecida.

Tabela 1 - Peptídeos sintetizados derivados dos domínios DC da botropasina.

Peptídeo	Sequência	PM
Ca II	VCGNELLEVGECD-OH	1379,53
Ca III	ECDPAEHCTGQSSECPADV-OH	1978,08
HCR	CKDNSPGQNNPCKMFYSNDDEHK-OH	2671,89

Fonte: próprio autor

3.2.2 Análise *in silico* das propriedades fisicoquímicas

As propriedades físico-químicas das sequências sintetizadas foram preditas utilizando ferramentas bioinformáticas como a plataforma ProtParam (GASTEIGER Et al., n.d.), I-

TASSER (*Iterative Threading ASSEmby Refinement*) (ZHANG 2008) e Anti-AngioPred (ETTAYAPURAM RAMAPRASAD et al. 2015).

3.3 Cultura celular e condições de cultura

Foi utilizada a célula endotelial de cordão umbilical humano HUVEC-CS obtida da ATCC (*American Type Culture Collection* – Manassas, VA, EUA) CRL-2873TM. Esta linhagem celular é derivada da passagem sucessiva da HUV-EC-C (CRL-1730) cultivada em meio sem o fator de crescimento ECGS, sendo um bom modelo celular para o teste de fatores angiogênicos. As células HUVEC-CS foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) suplementado com estreptomicina 100 mg/L, ampicilina 25 mg/L e 20% de soro fetal bovino (SFB) inativado. As células foram semeadas em garrafas revestidas com gelatina 0,1%/H₂O (1 hora a 37 °C) e incubadas a 37 °C em atmosfera úmida de 5% de CO₂, conforme a informação da ATCC.

Complementarmente foi utilizada a linhagem celular VSMC (*Vascular Smooth Muscle Cell*), célula da musculatura lisa vascular murina, cedida pelo Instituto Osvaldo Cruz. A linhagem foi cultivada em meio de cultura DMEM suplementado com streptomicina 100 mg/L, ampicilina 25 mg/L e 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado.

3.3.1 Sincronização da célula HUVEC-CS na fase G₀/G₁ do ciclo celular

Células HUVEC-CS em crescimento exponencial e subconfluentes foram lavadas com PBS (3 vezes) e crescidas em DMEM em concentrações mínimas de SFB (0,1%, 0,5% e 1%) por períodos de 24, 36 e 48 h. As amostras foram fixadas em etanol 70%/PBS e o conteúdo de DNA marcado com iodeto de propídeo e analisado por citometria de fluxo.

Após seleção da condição ótima para sincronização celular (0,1% SFB), as células foram cultivadas e sincronizadas nestas condições e tratadas com DMEM 20% SFB para avaliação e análise do reingresso no ciclo celular a cada 12 h.

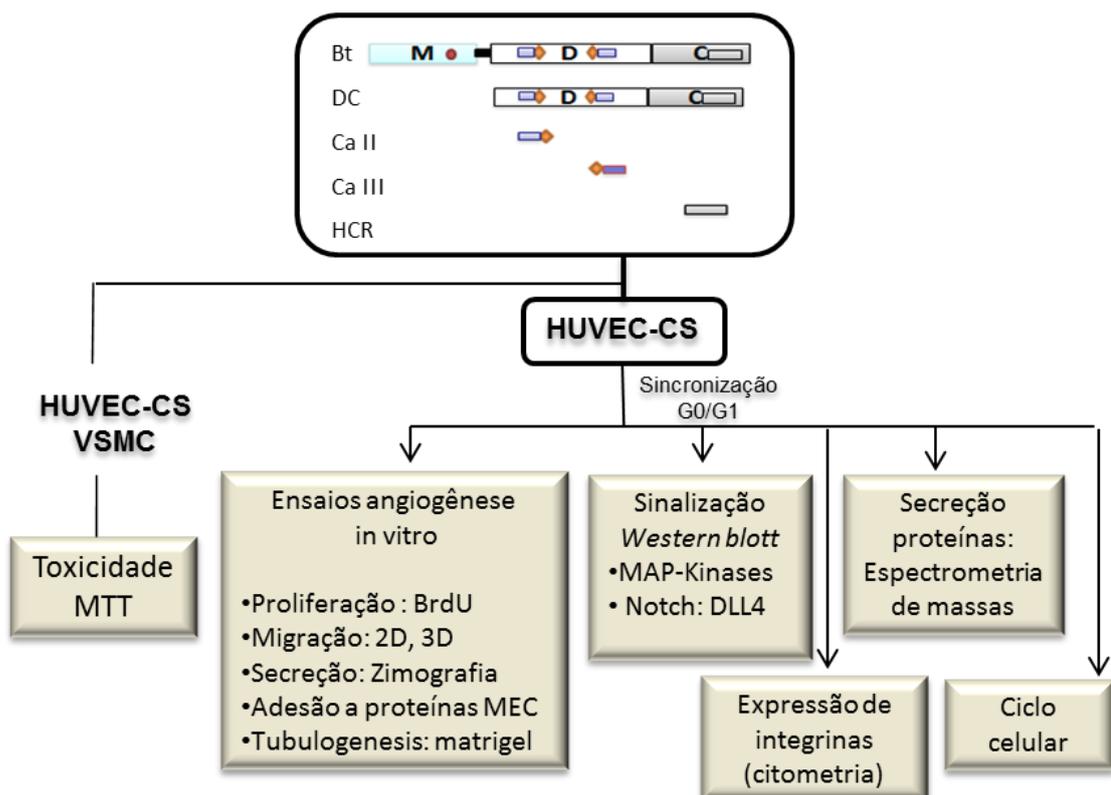
3.3.2 Avaliação de apoptose e necrose

Para avaliar se a sincronização celular com SFB 0,1% poderia induzir apoptose, células HUVEC-CS foram cultivadas em SFB 0,1% por 48 h, seguidamente foram tratadas por 24 h com hidróxido de terbutilo 5 µM (controle positivo de apoptose), SFB 20% (controle negativo

de apoptose), SFB 0,1%, Bt 100 nM, Bt 200 nM e HCR 50 nM. As células foram coletadas e ressuspensas em tampão de ligação a anexina V- FITC (HEPES/NaOH 10 mM, pH 7,4; NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM) seguido da adição de 5 µL de anexina V-FITC e 10 µL de iodeto de propídeo (PI), e incubado por 15 min a temperatura ambiente. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo obtendo 10.000 eventos por amostra. Os experimentos foram feitos em duplicata.

Após obter os tratamentos (purificação das proteínas Bt, DC e síntese dos peptídeos HCR, Ca II e Ca III) e padronizar a sincronização das HUVEC-CS na fase G0/G1 do ciclo celular, foram realizados os ensaios celulares da angiogênese *in vitro* segundo fluxograma (Figura 5).

Figura 5 - Fluxograma do desenho experimental.



M: Domínio metaloproteinase, D: Domínio tipo-disintegrina, C: Domínio Rico em cisteínas.

Ion zinco ●

Sequência ECD ◆

Peptídeos: █

Fonte: próprio autor

3.4 Citotoxicidade pelo método colorimétrico MTT

O método MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-1)2,5-difenil tetrazólio brometo], utilizado em testes de citotoxicidade e medição da viabilidade celular, mede a atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase em células viáveis metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983).

Para cada linhagem, HUVEC-CS e VSMC, 100 μ L de suspensão celular na concentração de 3×10^4 células/mL DMEM 20 % SFB foram distribuídas em placas de fundo plano de 96 poços e mantidas a 37 °C com 5% de CO₂. Após crescimento confluyente em 60-70% o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS estéril, e tratadas com 100 μ L das proteínas botropasina, DC (25, 50, 100, 500 e 1000 nM) e peptídeos Ca II, Ca III e HCR (50, 500, 1000 e 10.000 nM) em triplicata. Os poços controles receberam 100 μ L de meio de cultura 0% ou 20% SFB como controles negativo e positivo respectivamente. Após 24 horas de tratamento, o sobrenadante das culturas foi removido cuidadosamente e foi adicionado 20 μ L de MTT (5 mg/mL de PBS) em cada poço e incubado 3 horas a 37 °C. Os cristais de formazan foram solubilizados pela adição de 100 μ L de DMSO por poço e a absorbância foi quantificada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. Os tratamentos foram realizados em triplicata em três experimentos independentes. A média da leitura do controle foi considerada como 100% de viabilidade celular, sendo comparada com a média de cada tratamento para a determinação da porcentagem de células viáveis. O aspecto morfológico das culturas após o tratamento foi observado no microscópio invertido em aumento de 100X e registrado com câmara fotográfica.

3.5 Eventos da angiogênese *in vitro*

Nestes ensaios, após confluência celular aproximada de 60-70% pelo crescimento das células HUVEC-CS em meio de cultura DMEM 20% SFB, as células foram lavadas duas vezes com PBS e sincronizadas na fase G0/G1 do ciclo celular pelo crescimento em DMEM com 0,1% SFB por 48 horas. Seguidamente foram realizados os tratamentos por 24 horas com as proteínas Bt e DC, e os peptídeos HCR, Ca II e Ca III e avaliados seus efeitos nos diferentes eventos da angiogênese.

3.5.1 Proliferação celular pelo método de incorporação de BrdU

Foi utilizado o teste colorimétrico BrdU baseado na incorporação de bromodeoxiuridina (5-bromo-2'-deoxiuridina - BrdU) ao DNA na fase de síntese do ciclo celular. Esta técnica está acoplada ao uso de quimioluminescente e detecção em leitor de placas de ELISA.

Células HUVEC-CS na concentração de 8×10^4 células/mL foram distribuídas em placas de fundo plano de 96 poços (100 μ L /poço) e mantidas a 37° C com 5% de CO₂ até confluência celular de aproximadamente 60%. As células foram mantidas 48 h em SFB 0,1% e tratadas com 100 μ L das proteínas Bt e DC (25 – 500 nM), peptídeos Ca II, Ca III, HCR (50 – 1000 nM) e os controles: 0,1% SFB, 20 % SFB, FGF 20 ng/mL e VEGF 25 ng/mL. Após 12 horas de tratamento foi adicionado o marcador de proliferação celular BrdU (10 μ L de BrdU/poço na concentração de 10 μ M) e incubado por 14 h a 37 °C. O meio do sobrenadante foi removido por inversão da placa e as células foram fixadas com a solução FixDenat que denatura o DNA expondo o BrdU incorporado para imunodetecção. Seguidamente foi adicionado o anti-BrdU-POD por 2 h, as placas lavadas com PBS 3 vezes e adicionado o substrato até aparecer a coloração azul (30 min.). O produto da reação foi quantificado pela diferença das leituras de absorvância 370 - 492 nm em espectrofotômetro FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices). Os dados foram expressos como absorvância média \pm DP, em triplicata de 3 experimentos independentes.

3.5.2 Migração celular

A migração e invasão celular das células endoteliais foram analisadas pelo ensaio de fechamento de feridas (*Wound healing assay*) e o sistema de Câmeras de invasão transwell, respectivamente. Os ensaios foram realizados de acordo com os protocolos fornecidos pelos fabricantes e descritos brevemente abaixo.

3.5.2.1 Fechamento de ferida (*Radius assay*)

Foi utilizada placa de cultura de 24 poços (*Radius Cell Migration Assay Kit*, Cell Biolabs, INC) contendo um hidrogel circular de 0,68 mm na parte central de cada poço. Brevemente, 500 μ L/poço de células HUVEC-CS (2×10^5 células/mL) em meio DMEM 20% SFB foram adicionadas na placa e incubadas a 37° C até semiconfluência celular. Após

sincronização celular o meio foi aspirado, as células foram lavadas com PBS-A (3 vezes) e incubadas com 500 μL /30 min. da solução removedora do hidrogel, novamente as células foram lavadas observando-se a área central livre de células. Seguidamente as células foram tratadas com as proteínas Bt, DC (50 e 100 nM) e peptídeos Ca II, Ca III e HCR (50 e 1000 nM) por 24 h. As imagens foram obtidas em microscópio de contraste de fase Nikon (Eclipse TS100, Japan) e a migração celular foi calculada como a porcentagem da fechadura do círculo em relação a área inicial do círculo, e expressos como porcentagem media \pm DP, realizados em triplicata.

3.5.2.2 *Fechamento de ferida em superfície de colágeno IV*

Foram utilizadas placas de cultura de 24 poços (24- *Well Wound Healing Assay*: - CytoSelect) previamente incubadas com 300 μL de solução de colágeno IV (5 mg/mL) por 2 h a 37°C. O colágeno restante foi aspirado e os insertos lineares do kit colocados em cada poço para criar a ferida linear. Cuidadosamente foram adicionados 500 μL de suspensão celular (0.5×10^6 células/mL) em DMEM 20% SFB e sincronizados por 48 h. Os insertos foram retirados deixando a área linear livre de células, os poços lavados com PBS-A, e as células tratadas. Após ter realizado tratamento em ampla faixa de concentrações no ensaio de migração radial, no ensaio de fechamento da ferida foram utilizadas as concentrações de Bt (25, 50, 100 nM), DC (50, 100, 500 nM), peptídeos Ca II, Ca III e HCR (50, 500, 1.000 nM) e controles SFB 0,1%, SFB 20%, VEGF (25 ng/mL) e FGF (20 ng/mL). As células foram incubadas a 37°C por 24 h. As imagens foram obtidas em estereomicroscópio SMZ 745T Nikon, e a migração foi calculada como porcentagem da área das células que migraram em relação a área livre inicial.

3.5.2.3 *Invasão transwell em câmara de Boydem*

Foi utilizado câmara transwell com membrana porosa de policarbonato (8 μm poro) em placa de 24 poços (CytoSelectTM, Cell Biolabs, Inc). Brevemente, células HUVEC-CS suspensas em DMEM 0,1 % SFB na concentração de 10^6 células/mL, foram semeadas na câmara superior (300 μL) e incubadas a 37°C por 14 h. Na câmara inferior foram adicionados 500 μL das proteínas Bt (25, 50, 100 nM), DC (50, 100, 500 nM), peptídeos Ca II, Ca III e HCR (50, 500, 1.000 nM) e os controles DMEM 0,1% SFB, DMEM 20 % SFB, FGF_b 20 ng/mL e VEGF 25 ng/mL para atuar com quimioatraentes. O tratamento Bt também foi avaliado como agente estimulador da migração, sendo adicionado na parte superior da câmara. Após 24 h, as

células que não migraram foram delicadamente removidas com cotonete da parte superior da membrana, enquanto que as células que migraram para a parte inferior da membrana foram coradas com solução *Cell stain* e lavadas cuidadosamente. As imagens das células foram obtidas em microscópio invertido. Seguidamente, as membranas contendo as células foram submergidas em 200 µL do buffer de extração por 10 minutos sob agitação, e 100 µL foram utilizados para a quantificação em placa de 96 poços a 560 nm de absorbância em leitor FlexStation 3.

3.5.3 Atividade gelatinolítica por zimografia

Os sobrenadantes dos tratamentos dos ensaios de migração em substrato de colágeno foram utilizados para avaliar a secreção de enzimas gelatinolíticas MMP-9 e MMP-2 pelas células HUVEC-CS. Foi utilizada a metodologia de zimografia em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 8 % contendo gelatina B (2 mg/mL). As amostras foram diluídas em tampão de amostra em condições não redutoras e aplicadas nos poços dos géis (40 µL/poço). A eletroforese foi realizada a 130 Volts por um tempo médio de 60 minutos, seguido do lavado dos géis em tampão (Triton X-100 2.5%, Tris-HCl 50 mM pH 7.4) sob agitação por 10 m/ temperatura ambiente - 2 vezes para remoção do SDS, e a incubação em tampão para ativação das MMPs (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 200 mM, CaCl₂ 10 mM, ZnCl₂ 1 µM pH 7,4) por 18 h a 37 °C. Os géis foram corados com azul de Comassie por 2 horas e descorados sob agitação até aparecer as bandas da digestão. As imagens foram foto documentadas usando o transiluminador (UVITEC, Cambridge) usando o software Alliance UVI-1D.

3.5.4 Adesão celular a proteínas da Matriz extracelular (MEC)

Com a finalidade de saber se os tratamentos estimulam a expressão ou inibição de receptores de adesão a proteínas específicas da matriz extracelular, foi utilizado o *Kit 48 well CytoSelect ECM array - colorimetric assay*. Garrafa de cultura contendo células HUVEC-CS sincronizadas na fase G0/G1 foram tripsinizadas, lavadas por centrifugação e ressuspensas em meio de cultura sem soro contendo 0.5% BSA, 2 mM CaCl₂ e 2 mM MgCl₂. As células foram distribuídas em tubos de microcentrifuga (10⁶ células/mL) e os tratamentos adicionados na concentração final de Bt, DC (25, 100 nM), Ca II e Ca III (10, 50, 500 nM), HCR (10, 50, 500, 1000 nM), VEGF 25 ng/mL, SFB 20% e controle sem tratamento. Após agitação por 3 h

a temperatura ambiente, 150 μ L da suspensão celular foram adicionadas em cada poço da placa revestida com as proteínas da MEC (fibronectina, fibrinogênio, colágeno IV, colágeno I, laminina ou BSA como controle) e incubadas a 37° C. Após 3 horas de incubação, tempo médio de adesão desta linhagem, o sobrenadante foi retirado, e as células foram lavadas cuidadosamente com 250 μ L PBS-A (4 vezes) sem deixar secar os poços. Seguidamente, 200 μ L/poço de solução corante foram adicionados e incubados durante 10 min/ T ambiente, os poços foram lavados com 500 μ L de água destilada (5 vezes) e 200 μ L/poço da solução de extração foram adicionados. e mantidos sob agitação por 10 m. Finalmente, 150 μ L foram adicionados em placa de 96 poços para quantificação a 540 nm de absorbância, obtendo uma leitura proporcional ao número de células aderidas.

3.5.5 Formação de túbulos em Matrigel

Para saber se as células HUVEC-CS apresentam capacidade de formação *in vitro* de túbulos capilares em resposta ao tratamento, células tratadas foram semeadas sobre matriz 3D de Matrigel (BD, Biociences, E.U.A.). Brevemente, células crescidas em placas de 24 poços, sincronizadas foram tratadas com as concentrações angiogênicas definidas nos experimentos anteriores: Bt (25, 100 nM), DC (50 nM), os peptídeos HCR, Ca II e Ca III (50 nM), SFB 20%, SFB 0,1% e VEGF 25 ng/mL. Após 24 h, o sobrenadante foi eliminado e as células tripsinizadas, lavadas, coletadas e ajustadas para 8×10^4 células contidas em 200 μ L. Simultaneamente, placas de 96 poços foram revestidos com 60 μ L de Matrigel e mantidos por 1 hora a 37 °C para polimerização, seguidamente as células contidas em 200 μ L do tratamento foram adicionadas cuidadosamente na superfície central da matriz e incubadas a 37° C., observandose a formação de túbulos até 14 horas. Os tubos endoteliais formados foram fotografados em microscópio de contraste de fase e quantificados usando o programa Image J.

3.6 Expressão de proteína

Para determinação da expressão de proteínas celulares em resposta aos tratamentos, foram utilizadas diversas metodologias (western blot, citometria de fluxo, imunofluorescência) com a finalidade de determinar as vias de sinalização envolvidas em resposta ao tratamento.

3.6.1 Lisados Celulares

As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM SFB 20% na concentração de 1×10^5 células/mL em placas de Petri de 100x20 mm e incubadas a 37°C. Após confluência celular de 70% as células foram sincronizadas por 48 horas e seguidamente tratadas com as proteínas Bt (25 nM) e DC (100 nM) e peptídeo HCR (50 nM) nos tempos de 5, 10, 30 minutos, 2 e 24 horas. Os sobrenadantes foram coletados para análise do perfil de proteínas secretadas. As células foram lavadas com 1 mL de PBS gelado por duas vezes, incubadas com buffer de lise celular (*Cell Signaling* #9803) (300 µL/placa) durante 5 minutos e imediatamente removidas e coletadas em tubos de centrífuga *eppendorf*. Os lisados celulares foram centrifugados a 14000 rpm/4°C/10 min, e sobrenadante foi coletado e determinado a concentração de proteína total pelo método de Bradford. As amostras foram estocadas a -20 °C para separação das proteínas por SDS-PAGE e análise por western blotting.

3.6.2 Eletroforese em SDS-PAGE e Western blotting

Géis de poliacrilamida (10-12%) foram preparados para separação das proteínas por eletroforese (SDS-PAGE). Os lisados celulares foram diluídos em tampão de amostra e fervidos durante 5 minutos a 95 °C para denaturar as proteínas. O volume equivalente a 20 µg de proteína total/poço foram carregados nos géis e corridos em tampão (25 mM de tris-base; 19,2 mM de glicina; 0,1% de SDS – *Sodium dodecyl sulfate*) sob voltagem constante de 120 V por cerca de 2 horas ou até que o azul de bromofenol atinja o final do gel.

Para ensaios de western *blotting* foi montado um sanduíche composto por papel para *blotting* (Whatman 3M), gel, membrana de nitrocelulose (Hybond C) e papel para *blotting* previamente umedecidos em tampão de transferência (47,9 mM de tris-base; 38,6 mM de glicina; 0,037% de SDS; 20% de metanol) e uma esponja para cada lado. A transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em sistema gelado em cuba (*Wet/TankBlotting Systems/Bio-rad*) a 25 V constante *overnight*. Para verificar a transferência das proteínas, as membranas foram coradas com Ponceau (0,1% Ponceau e 1% ácido acético) por 2 minutos e descoradas em água destilada. As membranas foram incubadas em solução de bloqueio (leite em pó 5%, Tween-20 0.1% em TBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. A imunodeteção foi realizada incubando com anticorpo primário *overnight* a 4°C diluído em TBS-T/ leite conforme descrito na tabela 2, seguida pela incubação com anticorpo secundário

anti-coelho ou anti-camundongo conjugado com HRP (1:3000). Após a incubação com cada anticorpo, as membranas foram lavadas com TBS-Tween 0.1% durante 10 minutos, 3 vezes.

As membranas foram reveladas segundo protocolo do sistema ECL (GE Amersham) incubando por 1 minuto na solução reveladora e exposta por tempo variável. Os níveis de expressão relativa foram medidos pela análise da densitometria das bandas quantificadas usando o programa UVI-1D do transiluminador. Os lisados celulares foram obtidos em três experimentos independentes. A imunodeteção de β -actina foi realizada como controle de equalização da proteína.

Tabela 2 - Anticorpos primários e secundários usados para western *blotting*

Anticorpo	Origem	Fabricante	Diluição
FAK (A-17) sc-557	Anticorpo policlonal de coelho	Santa Cruz	1:1000
P-FAK (A-12) sc-374668	Ac. monoclonal de camundongo	Santa Cruz	1:500
Akt 1/2/3 (H-136) sc-8312	Ac. policlonal de coelho	Santa Cruz	1:1000
p-Akt 1/2/3 (B-12) sc-377556	Ac. monoclonal de camundongo	Santa Cruz	1:500
ERK 1/2 (H-72) sc-292838	Ac. policlonal de coelho	Santa Cruz	1:1000
p-ERK (E-4) sc-7383	Ac. monoclonal de camundongo	Santa Cruz	1:500
p38MAPK (D13E1)	Ac. monoclonal de coelho	Cell signaling	1:1000
P-p38MAPK (T180/Y182) D3F9	Ac. monoclonal de coelho	Cell signaling	1:500
Anti-DLL4 Ab7280	Ac. policlonal de coelho	Abcam	1:1000
VEGF-R2 ab39256	Ac. policlonal de coelho	Abcam	1:500
Actina (H-6) sc-376421	Ac. monoclonal de coelho	Santa Cruz	1:1000

3.6.3 Inibição de MEK/ERK com U0126

Para verificar se a via de sinalização de Erk da via das MAPKK é a responsável pelos efeitos proliferativos e migratórios, foi utilizado o inibidor MEK U0126 (Promega), inibidor de MAPKK MEK. Células HUVEC-CS semeadas em placas 60 mm foram sincronizadas por 48 h, e pré-tratadas com 1 μ M do inibidor MEK U0126 por 30 minutos, seguidamente foram tratadas com as concentrações com efeito tubulogênico confirmado: BT 25 nM, DC 100 nM, e HCR 25 nM por 10 e 30 minutos. A obtenção dos lisados celulares e análise por western blot foram realizados segundo os procedimentos já descritos. Simultaneamente, foram realizados os ensaios funcionais de proliferação e migração celular com ou sem inibidor avaliando-se após 18 h, seguindo a metodologia anteriormente descrita.

3.6.4 Citometria de fluxo

A expressão de proteínas de superfície integrinas $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$ que possam sinalizar na angiogênese foi determinada por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. Após o tratamento das células por 24 h em placas de 60 mm, as células foram lavadas, tripsinizadas e centrifugadas em PBS-A gelado a 2000 rpm por 5 min a 4° C. As células foram ressuspensas e fixadas com paraformaldeído (2% em PBS-A) até a análise. No dia da análise, as células foram lavadas em PBS gelado, permeabilizadas com Triton X-100 (0,1%) por 30 minutos a 4 °C. As suspensões celulares foram lavadas e ressuspensas em tampão FACS e adicionado 1 μ g do anticorpo primário específico para a proteína. Na avaliação dos receptores de superfície (FGF-R1, VEGF-R2) a membrana celular não foi permeabilizada. Após 1 hora de incubação célula- anticorpo, as células foram centrifugadas 1500 rpm por 10 minutos, e adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgG-FITC/PE específico ao anticorpo primário e incubado por mais 1 hora a 4 °C protegidos da luz. As células foram lavadas por centrifugação e ressuspensas em tampão FACS. Foram adquiridas 10.000 eventos/amostra no citômetro de fluxo BD FACSCalibur/ BD FACSCanto II (*Fluorescence Activated Cell Analyser – Becton e Dickinson, USA*) dos equipamentos multiusuários do Instituto Butantan. Os dados foram analisados com o programa WinDI.

3.6.5 Microscopia de fluorescência

Placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro de 30 mm foram sensibilizadas com colágeno I (15 µg/3 mL PBS/placa) por 1 h a 37 °C e bloqueadas com BSA/PBS (2 mg/mL) durante 1h a 37 °C. Foram adicionadas 400 µL de células HUVEC-CS ressuspendidas em DMEM 20% SFB (1x10⁵ células/mL) e incubadas a 37 °C em 5% CO₂ por 16 h ou até confluência celular de 70%, seguidamente os poços foram lavados duas vezes com PBS-A e as células carenciadas por 48 horas em 500 µL de DMEM 0,1% SFB. Os tratamentos foram adicionados e incubados por 20 h a 37 °C. As células foram lavadas 2 vezes com PBS-A, fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos a temperatura ambiente e novamente lavadas 2 vezes com PBS-A. Seguidamente as células foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1% em PBS durante 5 min a 4 °C, lavadas com PBS e incubadas em solução de BSA 2% em PBS sob agitação por 5 minutos para bloquear as interações proteína-proteína não específicas. As células foram incubadas 3 h com o anticorpo primário diluído na solução de bloqueio, seguida por duas lavagens de 5 minutos em PBS e a incubação com o anticorpo secundário anti-isótipo (verde) conjugado a Alexa Flúor por 1h a temperatura ambiente protegida da luz, nos últimos 5 minutos foram adicionados 20 µL de DAPI (4-6 diamidino-2-fenilindolo) diluído 1:1000 para corar os núcleos celulares (azul) a uma concentração de 1,43 µM. Finalmente as lâminas foram novamente lavadas 3 vezes em PBS e montadas com solução para fluorescência DAKO. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência Olympus XM10 no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, ou no microscópio confocal de varredura a Laser LSM 510 META do laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan.

3.7 Expressão de proteínas secretadas no sobrenadante celular

Os sobrenadantes dos tratamentos com as proteínas Bt (25 nM) e DC (100 nM) e peptídeo HCR (50 nM) do experimento de sinalização celular (0, 5, 10, 30 min, 2 h e 24 h) foram coletados, e as proteínas do sobrenadante separadas por SDS-PAGE 8%, seguido pela coloração do gel com prata para análise do perfil de proteínas secretadas. A expressão forte de proteína no gel foi selecionada para digestão e análise por espectrometria de massas.

3.7.1 Coloração do gel com prata

O gel foi colocado em 50 mL de solução fixadora (50 µL de formaldeído a 37%, ácido acético 12% e metanol 50%) e esquentado no micro-ondas (potência máxima) por 30 segundos e agitado por 5 min a temperatura ambiente. O gel foi lavado com 50 mL de etanol 50% por duas vezes de 30 segundos cada lavagem. O gel resultante foi sensibilizado com 0,02% de tiosulfato de sódio por 30 segundos no micro-ondas, agitação 2 minutos, e lavado com água destilada por 30 segundos no micro-ondas mais 2 minutos de agitação a temperatura ambiente (2 vezes), o gel foi incubado em 50 mL de solução de prata por 30 segundos no micro-ondas e agitação por 5 minutos a temperatura ambiente (75 µL de formaldeído 37% e 200 mg de AgNO₃ para 100 mL de água). O gel foi lavado em água destilada por 40 segundos e seguidamente colocado em solução de revelação (50 µL de formaldeído 37%; 400 µL de tiosulfato de sódio (1mg/mL) e 6 g de carbonato de sódio em 100 mL de água). Quando apareceram as bandas de proteínas, estas foram deixadas até a saturação para observar as mínimas quantidades de proteínas expressas, por ser de interesse. A reação foi parada pela adição de solução de ácido acético 5% por 5 minutos. As imagens foram obtidas em transiluminador UVITEC.

3.7.2 Digestão in gel

O perfil proteico dos tratamentos para sinalização celular com as proteínas Bt e DC e o peptídeo HCR foram analisados por gel de poliacrilamida e observados a expressão de proteína tempo dependente. A banda majoritária de cada tratamento foi recortada com auxílio de um bisturi e submetida ao processo de digestão com tripsina segundo protocolo de Hanna et al, (2000), com respectivas modificações.

A banda do tratamento com DC, outra da Bt, e uma banda da albumina como controle do procedimento, foram digeridas do gel para posteriormente serem identificadas por espectrometria de massas. A digestão do gel foi realizada segundo a breve descrição: As bandas recortadas foram imersas em solução descorante (metanol 50%; ácido acético 5% em água ultrapura) - 500 µL em temperatura ambiente até descoradas completamente, seguidamente a solução foi removida por aspiração e o gel foi desidratado com 200 µL de ACN (100%) por 10 minutos em temperatura ambiente. Após descarte da acetonitrila, as amostras foram reduzidas com 30 µL de solução de DTT 10 mM (1,5 mg de DTT /1 mL de NH₄HCO₃ 100 mM) por fragmento de gel, incubados por 30 minutos a temperatura ambiente. O DTT foi removido e foi

adicionada 30 μL da solução alquilante de IAA 50 mM (9 mg de iodoacetamida em 1 mL de NH_4HCO_3 100 mM), incubados por 30 minutos, ao abrigo de luz. A solução alquilante foi removida e os fragmentos do gel passaram por processos de desidratação e reidratação, utilizando-se solução de ACN 100% durante 30 minutos e solução de NH_4HCO_3 (100 mM) por 10 minutos, respectivamente. Cada fragmento do gel foi digerido com 16 μL de tripsina (100 $\mu\text{g}/2\text{ mL}$ NH_4HCO_3 50 mM) e incubação a 37°C por aproximadamente 12 horas.

3.7.3 Identificação da proteína por Espectrometria de massas

A identificação da proteína digerida do gel tratado foi realizada por espectrometria de massas, sendo uma banda de albumina digerida utilizada como controle do experimento. As amostras dos géis foram ressuspendidas em 10 μL de solução de ácido fórmico 0,1% e analisadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem – LC-MS/MS, utilizando-se o equipamento LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific Inc.) acoplado ao sistema de nano-cromatografia líquida Easy-nLCII (Thermo Fisher Scientific Inc.). 5 μL de cada amostra foram injetados automaticamente em pré-coluna Júpiter C-18 (10 μm ; 100 μm x 50 mm) (Phenomenex) acoplada a uma coluna de fase reversa analítica ACQUA C-18 (5 μm , 75 μm x 100 mm) (Phenomenex). Foi utilizado um gradiente linear de 0 a 80% de ACN em ácido fórmico 0,1% por 20 minutos e um fluxo 200 nL/min. A fonte de ionização foi operada em modo positivo em 1.8 Kv.

3.7.4 Análise dos dados

Os dados referentes às análises por espectrometria de massas, pelo aparelho LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific Inc.) no formato *raw* foram processados pelo software PEAKS Studio (versão 8.5, Bioinformatics Solutions Inc., Canada) submetidos à análise no banco de dados humano UNIPROT. Os dados foram analisados com carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável. Erro de massa 10 ppm, tolerância do fragmento 0,6 Da, considerando $-10 \text{ LgP} > 20$ para análise.

3.8 Ciclo celular

As células foram cultivadas na concentração de 5×10^5 células em placas de Petri de 35 mm, meio de cultura com 20% SFB e incubadas a 37 °C por 24 horas. O sobrenadante foi retirado e as células tratadas com Bt, DC, HCR, Ca II, Ca III, e SFB 20% como grupo controle, sendo cada tratamento realizado em triplicata. Após 24 horas, as células do sobrenadante e as aderentes foram coletadas, e lavadas em PBS duas vezes e fixadas em 1 mL de etanol gelado 70% e estocadas a -20 °C. No dia da análise, as células foram novamente centrifugadas, e o botão celular ressuspense em solução contendo 200 µL de tampão FACSTFlow, 20 µL de RNase-A (10 mg/mL) e 20 µL de solução de iodeto de propídeo (20 mg/mL). A solução foi cuidadosamente agitada e deixada protegida da luz no gelo por 1 hora. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II e analisadas com o software FACSDiva versão 6.1.3. Por cada amostra foram adquiridos 10000 eventos e os resultados foram expressos em porcentagem de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular: G0/G1, S, G2/M e células sub-haploides (Sub-G1).

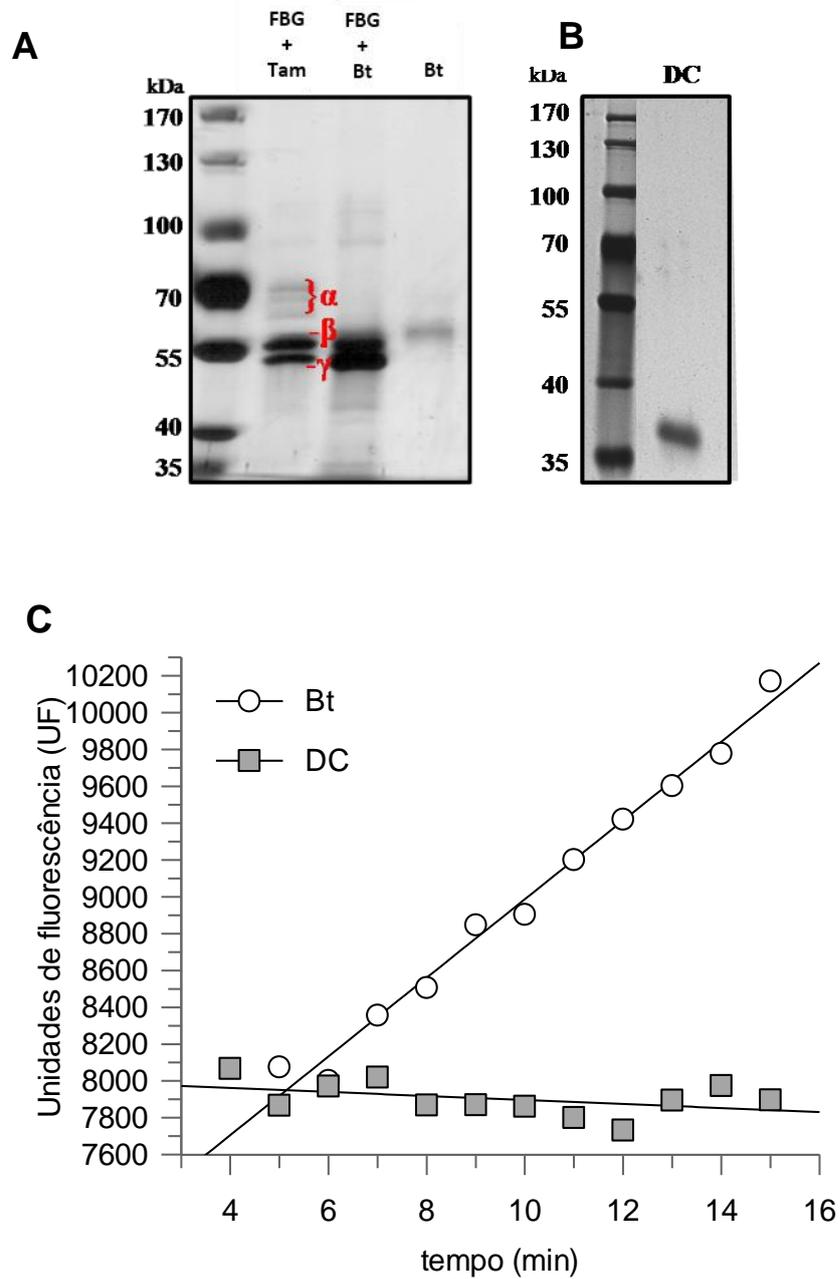
4 RESULTADOS

No presente trabalho nós avaliamos os efeitos pró-angiogênicos *in vitro* das proteínas botropasina e os seus domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas (DC) e de peptídeos sintéticos Ca II, Ca III e HCR derivados da sequência da botropasina. Assim, foi verificada a atividade enzimática da botropasina e a sincronização da célula HUVEC-CS. Esta sincronização celular (estado quiescente) é o ponto de partida para a posterior avaliação dos eventos centrais da angiogênese *in vitro* (proliferação, migração e diferenciação), e outros ensaios complementares que avaliam a adesão celular a proteínas da matriz extracelular, a expressão de integrinas envolvidas e a via de sinalização. A célula endotelial HUVEC-CS é o eixo de todos nossos experimentos, no entanto, também foi usada a célula não endotelial SVMC (célula vascular da musculatura lisa) que faz parte do processo angiogênico, para dar maior robustez a nossa avaliação *in vitro*.

4.1 Atividade enzimática da botropasina e domínios DC

A botropasina é uma enzima com atividade proteolítica sobre o substrato fibrinogênio, enquanto que os domínios DC são inativos, deste modo sua atividade funcional e integridade foram verificadas previamente a realização dos ensaios *in vitro*. Como mostrado na figura 6 A, a botropasina mostrou atividade enzimática fibrinogenolítica clivando preferencialmente a cadeia α do fibrinogênio, sendo as cadeias β e γ mantidas na sua integridade (FBG + Bt). O controle da enzima botropasina (Bt) mostrou-se como única banda de aproximadamente 52 kDa, enquanto que a condição da digestão fibrinogênio e tampão (FBG + Tam) mostrou as cadeias α (64 kDa), β (55 kDa) e γ (47 kDa) na sua integridade. A eletroforese dos domínios DC, mostrou a pureza da proteína com massa molecular de 28 kDa (Fig. 6B). A avaliação da atividade hidrolítica da botropasina e domínios DC sobre o substrato FRET mostrou a atividade específica da Bt (2135,4 UF/min/ μ g) frente ao substrato Abz-FRSSR-EDDnp, enquanto que o domínio DC mostrara-se sem atividade com UF basal constante (Fig 6C). O tampão Tris-HCl 80 mM, pH 7,4 e CaCl₂ 1 mM não apresentou atividade frente aos substratos sintéticos.

Figura 6 - Avaliação da atividade enzimática da Bt e DC



(A) Atividade fibrinogênolítica da botropasina sobre o substrato fibrinogênio (FBG): a condição controle (FBG + Tampão) mostra o FBG com suas respectivas cadeias α , β , γ , e sua digestão pela botropasina (FBG + Bt) e controle da enzima (Bt); (B) Eletroforese da proteína DC da botropasina; (C) Atividade hidrolítica de 0,1 μ g de Bt e DC sobre o substrato Abz-FRSSR-EDDnp.

4.2 Propriedades *in silico* dos peptídeos

4.2.1 Propriedades físico-químicas *in silico* dos peptídeos

As características ou propriedades dos peptídeos sintetizados Ca II, Ca III e HCR foram preditas usando ferramentas bioinformáticas. As sequências dos peptídeos foram analisadas pelas plataformas ProtParam (ExpASy) obtendo as propriedades físico-químicas (Tabela 3) como massa molecular (PM), ponto isoelétrico (pI), índice de instabilidade (II), cargas positivas e negativas, a média de hidropaticidade (GRAVY) e o tempo de vida média.

Tabela 3 - Propriedades preditas dos peptídeos sintéticos pelo ProtParam.

	Ca II	Ca III	HCR
Nº de resíduos	13	19	23
PM (g/mol)	1379,5413	1978	2671,9073
pI teórico	2,9	3,83	5,3
II	60,20	143,93	59,50
Total de resíduos com carga negativa	(Asp + Glu): 5	(Asp + Glu): 5	(Asp + Glu): 4
Total de resíduos com carga positiva	(Arg + Lys): 0	(Arg + Lys): 0	(Arg + Lys): 3
Carga total	-5	-5	-1
Hidrofobicidade	25,57	-0,779	-1,88
Tempo vida média (h) <i>in vitro (mammalian)</i>	100 h	1 h	1,2 h
GRAVY	0.21	-0.779	-1.878

PM: peso molecular

pI: ponto isoelétrico

II: índice de instabilidade (<40 considerado estável)

GRAVY: média da hidropaticidade

O pI teórico dos peptídeos, no qual eles se encontram com carga neutra, apresenta valores entre 2,9 e 5,3, isto indica, que sob- condições experimentais *in vitro* (pH 7,6) os peptídeos se encontram com carga residual negativa.

A análise do Índice de Instabilidade (II) da sequência de aminoácidos pelo ProtParam, onde peptídeos com valores de II > 40 são considerados instáveis, mostra que os três peptídeos são instáveis. Esta análise está baseada nas propriedades dos resíduos que compõem o peptídeo, podendo ser propensos a reações laterais e produção de subprodutos ao longo do tempo. As

médias do índice de hidropaticidade (GRAVY: *Grand average of hydropathicity*) negativos indicam a tendência destes peptídeos a interagir com o meio aquoso.

4.2.2 Atividade anti-angiogênica

A análise do potencial da atividade anti-angiogênica dos peptídeos pela servidor AntiAngioPred, considerando toda a sequência do peptídeo (Whole peptídeo AAC method) e limite de 0,5, mostrou o peptídeo HCR com maior possibilidade de ser um peptídeo angiogênico (escore negativo), enquanto os peptídeos Ca II e Ca III apresentaram atividade antiangiogênica (escore positivo) como indicado na tabela 4. Esta predição foi posteriormente confirmada em ensaios celulares *in vitro*, considerando a proteção dos resíduos em todos os peptídeos.

Tabela 4 - Predição da atividade antiangiogênica dos peptídeos

Peptídeo	Escore	Predição	Hydrophilicity	carga	PM
CAII	0.04	Anti-angiogenic	0.28	-4.00	1379.71
CA III	1.32	Anti-angiogenic	0.49	-4.50	1978.31
HCR	-0.01	Non-anti-angiogenic	0.61	-0.50	2672.19

ID: Ca II 45434, Ca III 39381, HCR 42465.

Fonte: AntiAngioPred

4.2.3 Estrutura dos peptídeos

As sequências dos resíduos no programa SPICKER (I-TASSER) gerou cinco modelos da estrutura conformacional para cada um dos peptídeos, onde a confiança de cada modelo é medida quantitativamente pelo C-escore, sugerindo os modelos da figura 7 como os mais confiáveis.

4.2.5 Análise in silico do peptídeo HCR

Após a análise *in silico* das propriedades dos peptídeos e experimentos *in vitro* que mostraram o peptídeo HCR com características angiogênicas, o peptídeo HCR foi analisado usando os métodos bioinformáticos I-TASSER e BLAST.

O I-TASSER usa o programa de alinhamento estrutural TM-align para corresponder o primeiro modelo estrutural (Figura 7) com proteínas de outros organismos que apresentem estruturas semelhantes, ajudando a inferir algumas das funções do modelo estrutural. A tabela 5 mostra as principais proteínas que têm a similaridade estrutural mais próxima com o modelo do HCR predito, podendo ser uma proteína de sinal, hidrolase ou proteína da síntese de novo.

Tabela 5 – Proteínas estruturalmente semelhantes ao peptídeo HCR.

	NOME	Classificação	Organismo	IDEN ^a	Cov
1	Plexina A4 região extracelular	Proteína sinal	<i>Mus musculos</i>	0.095	0.826
2	EcfA-A' heterodímero de união ao ADP	Hydrolase	<i>Thermotoga maritima</i>	0.000	0.783
3	PBP-like proteína	Proteína de novo	<i>E. coli</i> , <i>T. maritima</i>	0.087	0.696
4	Plexina A2/complexo Semáforina 6A	Proteína sinal	<i>Mus musculos</i>	0.048	0.870

IDEN: percentagem de identidade de sequência na região estruturalmente alinhada.

Cov: cobertura do alinhamento por TM-align. Cov é igual ao número de resíduos estruturalmente alinhados dividido pelo comprimento da proteína de consulta.

Fonte: I-TASSER

O alinhamento da sequência do peptídeo HCR com a base de dados de proteínas humanas no BLAST (organismo: *homo sapiens* taxid: 9606) mostrou similaridade com as proteínas descritas na tabela 6. Os resultados mostram que não há um bom alinhamento (alto E-value) provavelmente por ser procedentes de genomas diferentes, no entanto com alta percentagem de identidade o que pode ajudar na predição da função do HCR. Por exemplo: a proteína Notch (9-10) sinaliza na angiogênese e apresenta identidade de 78% com o peptídeo HCR o que poderia deduzir em funções semelhantes.

Tabela 6 - Alinhamento do peptídeo HCR com a base de dados de proteínas humanas do BLAST

	Descrição	Escore		cover	E- value	Ident
		Max	total			
1	Dachshund homologo 1 isoforma c Proteína hipotética, <i>human</i>	26.5	26.5	52%	6.6	67%
2	<i>dachshund gene</i> Precursor do receptor alfa-like,	26.5	26.5	52%	6.6	67%
3	familia GDNF	26.1	26.1	60%	9.3	57%
4	Receptor CR1 Região variável da cadeia pesada da	24.4	24.4	69%	22	59%
5	imunoglobulina alfa	24.8	24.8	30%	24	86%
6	Proteína associada ao poro nuclear	24.8	24.8	52%	26	58%
7	CR1L proteína	24.4	24.4	69%	35	59%
8	Receptor 1 do complemento CR1 Cadeia A, do dímero do complexo de transcrição de Notch em Hes1	24.4	199	86%	37	59%
9	DNA Cadeia C de Notch ativado do	24.0	24.0	34%	51	78%
10	promotor Hes-1	24.0	24.0	34%	51	78%

Fonte: I-TASSER

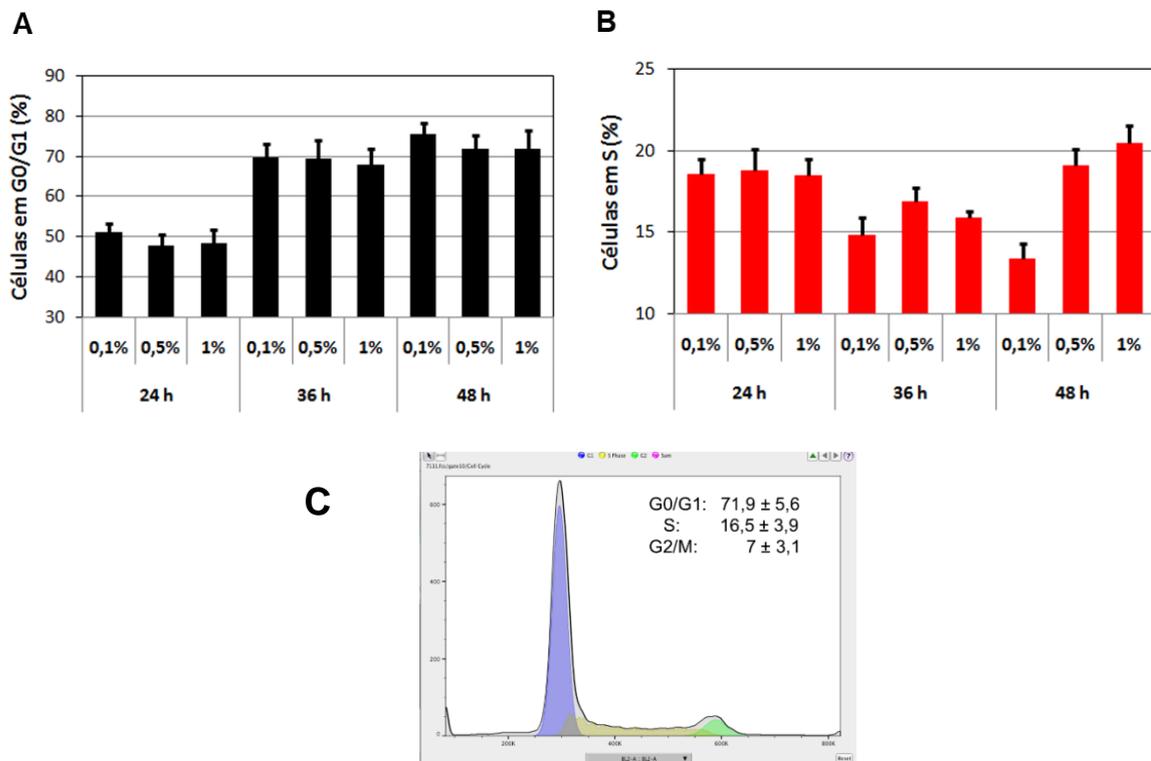
4.3 Células HUVEC-CS

4.3.1 Sincronização celular na fase G0/G1

Células endoteliais encontram-se normalmente em estado quiescente (não proliferativo) nos vasos sanguíneos de adulto, até que sinais pró-angiogênicos do microambiente estimulem a entrada no ciclo celular. Com a finalidade de reproduzir esta condição fisiológica *in vitro* e obter uma população celular quiescente para avaliação dos eventos angiogênicos, foi padronizado a sincronização das células HUVEC-CS na fase G0/G1 do ciclo celular pela diminuição do SFB no meio de cultura.

Como mostrado na figura 8A, a maior porcentagem de células sincronizadas na fase G0/G1 do ciclo celular foi obtida após 48 h de crescimento em 0,1%; 0,5% e 1% de SFB, sem diferenças estatísticas entre as concentrações de SFB; no entanto, a concentração de 0,1% apresentou a menor porcentagem de células na fase S (13,4 %) em comparação às outras concentrações, sendo escolhida para a sincronização celular.

Figura 8 - Sincronização do ciclo celular da linhagem HUVEC-CS.



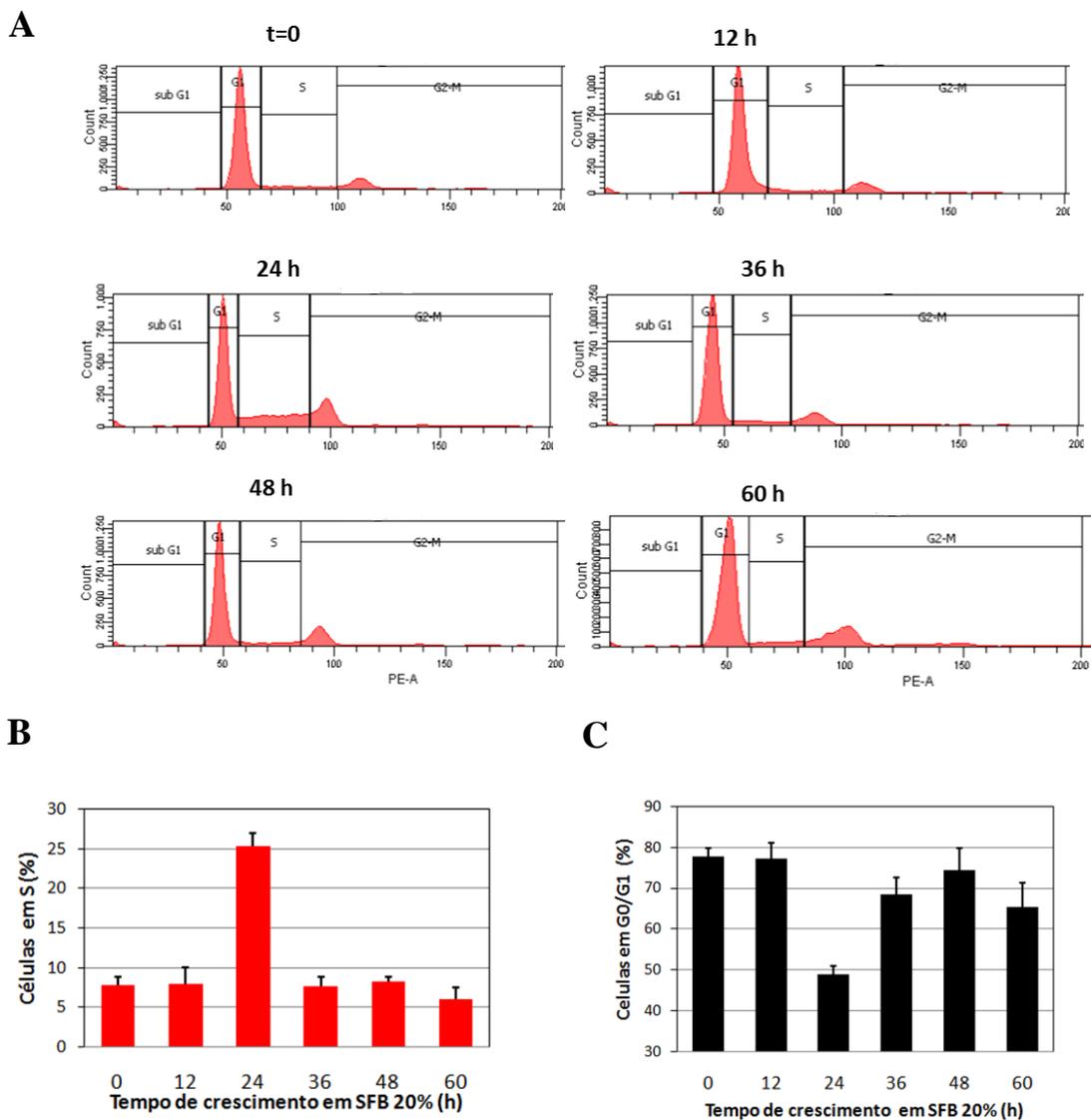
Quantificação das células HUVEC-CS na (A) fase G0/G1 e (B) fase S após incubação em DMEM 0,1%, 0,5% e 1% de SFB em DMEM por períodos de 24, 36 e 48 h. (C) Histograma representativo do ciclo da célula HUVEC-CS após sincronização celular com SFB 0,1% por 48 h. As células foram coletadas, fixadas e marcadas com PI para aquisição das fases do ciclo celular por citometria de fluxo.

4.3.2 Ciclo celular das células endoteliais sincronizadas

Após a sincronização celular com 0,1% SFB, o crescimento das células HUVEC-CS em meio DMEM 20% SFB mostrou a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular G0/G1, S e G2/M segundo os seguintes histogramas representativos (Figura 9A).

A quantificação das fases do ciclo celular mostrou que após 24 h de crescimento em SFB 20% alcançam a máxima porcentagem de células na fase S do ciclo celular (Figura 9B) com a correspondente diminuição na fase G0/G1 (Figura 9C). Este tempo de 24h foi utilizado posteriormente nas análise da proliferação celular, completando o ciclo celular em 36h.

Figura 9 - Ciclo celular das células HUVEC-CS.

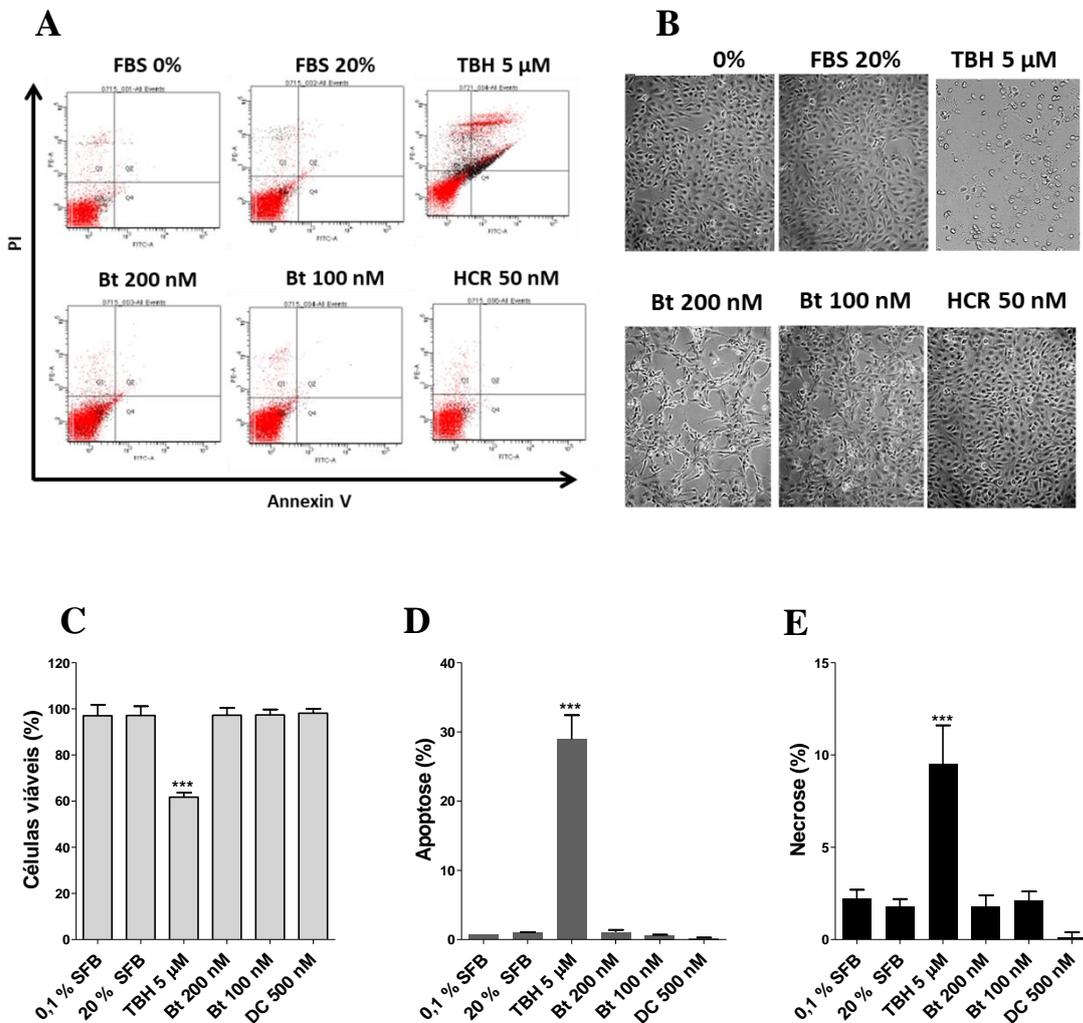


(A) Quantificação do DNA obtida por citometria de fluxo de células HUVEC-CS tratadas com 20% SFB para avaliação da progressão do ciclo celular durante 12, 24, 36, 48 e 60 h. Gráficos representando a distribuição das células na (B) fase S e (C) fase G0/G1 do ciclo celular.

4.3.3 Avaliação da apoptose e necrose

Sob-condição de sincronização e reingresso no ciclo celular após tratamento por 24 h, as células HUVEC-CS tratadas com o indutor de apoptose hidróxido de terbutilo ($5 \mu\text{M}$) mostraram 28,9% e 9,5% de células em apoptose e necrose, respectivamente, com morfologia alterada. Os tratamentos com botropasina 200-100 nM, HCR 50 nM, SFB 20% e 0,1% apresentaram aproximadamente 0,9% de células em apoptose, ~2% de células em necrose, e ~97,5% de células viáveis, sem diferenças estatísticas entre os tratamentos, a pesar da alteração morfológica observada no tratamento com Bt 200 nM. (Figura 10).

Figura 10 - Avaliação de apoptose das células HUVEC-CS.



Células HUVEC-CS sincronizadas por 48 h apresentam efeitos mínimos na apoptose e necrose. As células foram sincronizadas com FBS 0,1%, e tratadas por mais 24 h com FBS 0,1%, FBS 20%, Bt 200, Bt 100 nM, HCR 50 nM e terbutil hidróxi como controle positivo de apoptose. (A) Gráficos Dot plot de citometria de fluxo de células duplamente marcadas com anexina V- FITC e PI, (B) morfologia celular após 24 h de tratamento. Quantificação em porcentagem de (C) células viáveis, (D) células em apoptose e (E) células em necrose. Os asteriscos representam as diferenças significativas em comparação ao controle (***, $p < 0,001$).

4.4 Citotoxicidade das proteínas botropasina, DC e peptídeos Ca II, Ca III e HCR nas células HUVEC-CS e SVMC pelo método MTT

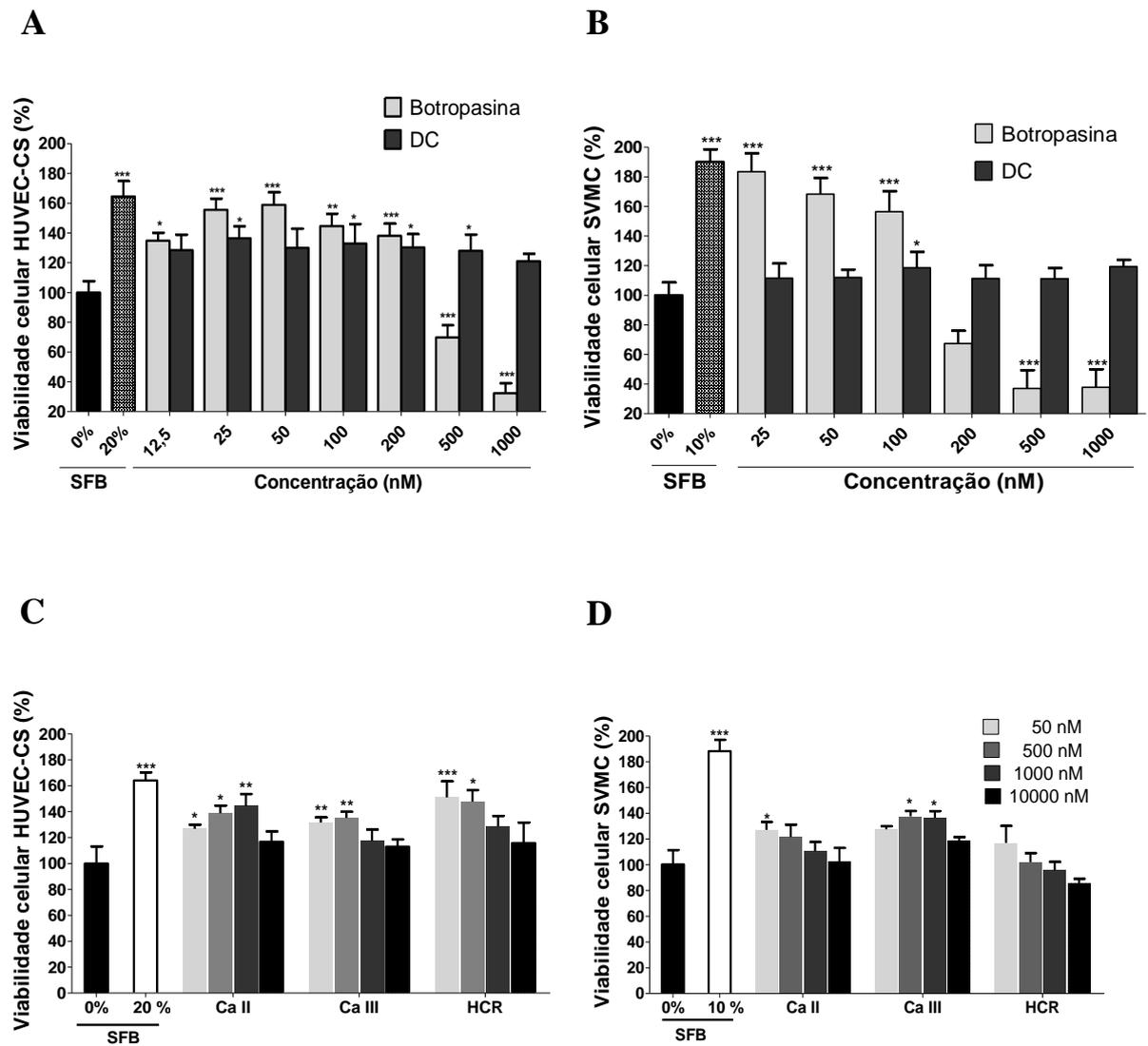
Foi avaliado a citotoxicidade das proteínas botropasina e DC, e peptídeos Ca II, Ca III, e HCR para determinar a faixa de concentrações que possam estimular a proliferação, excluindo as concentrações tóxicas. Duas linhagens celulares foram utilizadas, a célula endotelial HUVEC-CS, linhagem celular mais usada nos testes de angiogênese *in vitro*, e a célula SVMC que faz parte das células murais que estabilizam o endotélio.

Como mostrado na figura 11A, concentrações maiores a 200 nM de botropasina foram tóxicas para as células HUVEC-CS, enquanto que o tratamento com DC não mostrou toxicidade celular em nenhuma das concentrações avaliadas após 24 h. Na figura 11B, a linhagem celular SVMC mostrou-se mais sensível à botropasina, onde concentrações maiores 100 nM foram citotóxicas, e o tratamento com DC tampouco mostrou citotoxicidade. Os efeitos citotóxicos foram acompanhados pelas alterações na morfologia como a retração dos prolongamentos citoplasmáticos, perda da aderência, formação de agregados celulares observados nas células HUVEC-CS e SVMC em concentrações maiores a 200 e 100 nM, respectivamente (Figura 12). Células aderentes, refringentes com figuras de mitose de forma similar ao controle com SFB foram observadas nos tratamentos com botropasina em baixas concentrações.

Os peptídeos Ca II, Ca III e HCR não apresentaram toxicidade em nenhuma das concentrações avaliadas (50, 500, 1.000 e 10.000 nM) tanto na célula HUVEC-CS (Figura 11C) como na célula SVMC (Figura 11D), sendo a viabilidade das células maior ou igual ao controle 0% SFB.

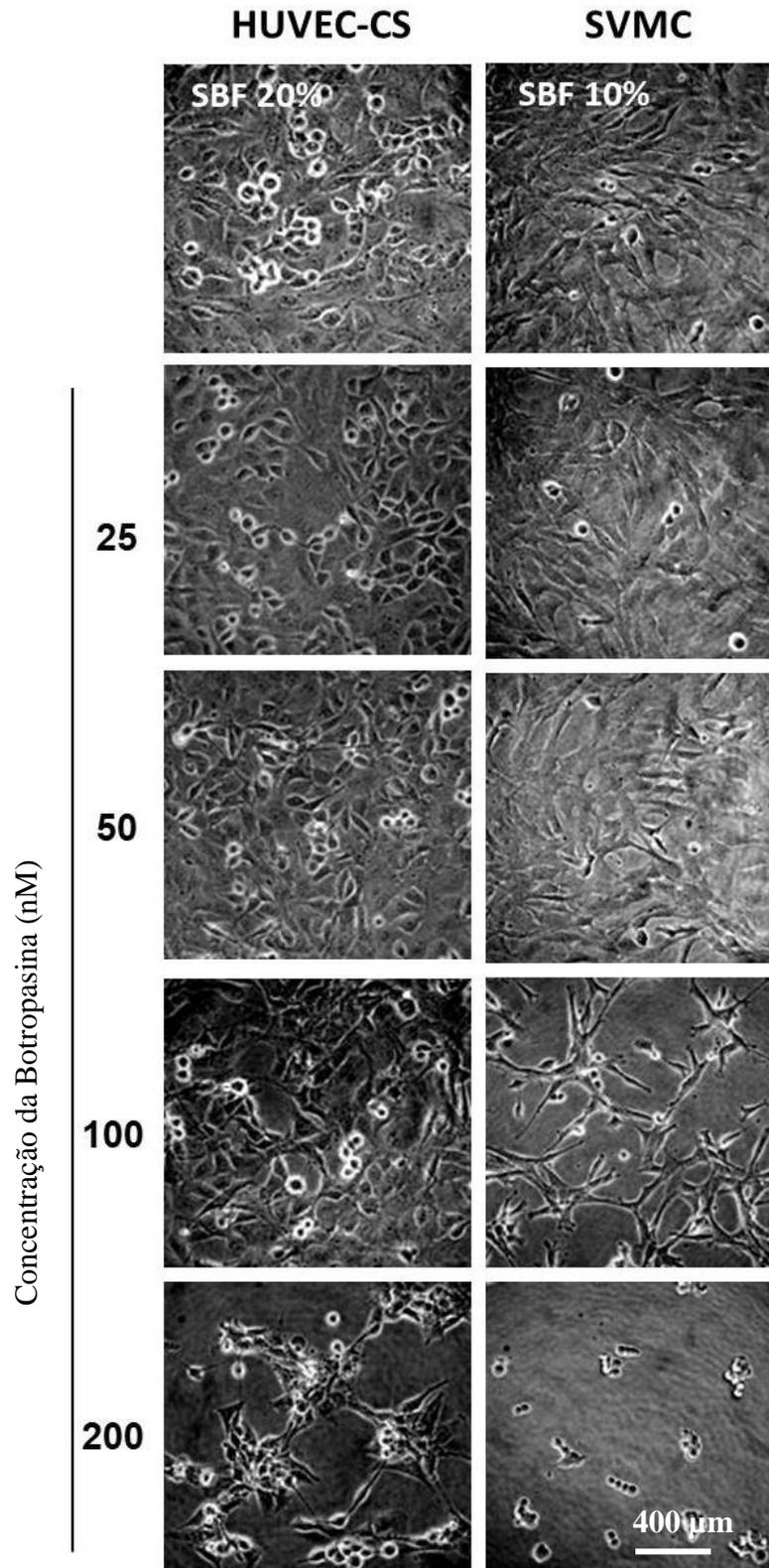
Estes dados mostram que para ensaios de angiogênese *in vitro*, deverão ser avaliadas concentrações menores a 200 nM de botropasina em células HUVEC-CS, e menores a 100 nM em células SVMC. A proteína DC e os peptídeos Ca II, Ca III e HCR podem ser avaliados em ampla faixa de concentrações.

Figura 11 - Citotoxicidade - método MTT.



Citotoxicidade das células (A, C) HUVEC-CS e (B, D) SVMC tratadas com as proteínas botropasina e DC, e os peptídeos Ca II, Ca III e HCR, avaliada pelo método MTT. A viabilidade celular foi calculada em relação ao controle sem tratamento (100% de viabilidade celular), sendo os dados expressos em porcentagem média \pm dp. Os asteriscos representam as diferenças significativas em comparação ao controle 0,1% SFB (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Figura 12 - Fotomicrografia em microscopia invertida de contraste de fase, mostrando o aspecto morfológico das células tratadas com botropasina.



Células HUVEC-CS e SVMC tratadas com botropasina e controle com SBF durante 24 h. Observa-se células aderentes com figuras de mitose em baixas concentrações da Bt, e retração citoplasmática com perda da aderência em concentrações maiores para ambas as linhagens celulares. Aumento 200X.

4.5 Eventos da angiogênese in vitro em resposta aos tratamentos com as proteínas botropasina, DC, e os peptídeos Ca II, Ca III e HCR

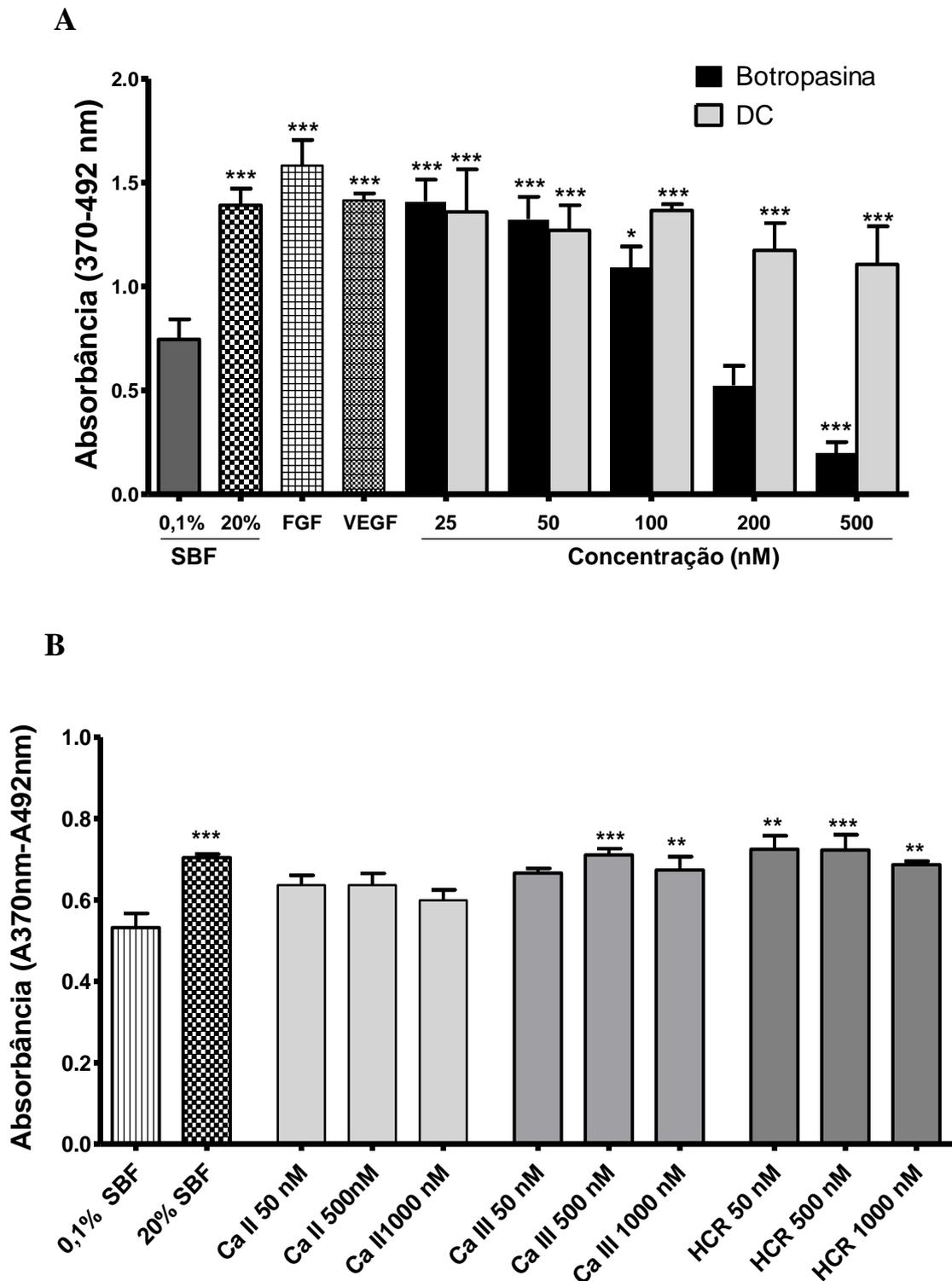
Na formação de vasos sanguíneos, as células endoteliais precisam realizar 4 etapas importantes: degradação da matriz adjacente, migração em direção ao estímulo angiogênico, proliferação celular para construir os vasos sanguíneos novos e reorganização em estruturas tubulares. Nestes ensaios as células endoteliais HUVEC-CS foram previamente sincronizadas na fase G0/G1

4.5.1 Proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada pelo teste colorimétrico BrdU que quantifica a síntese do DNA. Como mostrado na figura 13A, o tratamento com a Bt (25 - 100 nM) e DC (25 - 500 nM) mostraram atividade mitogênica com aumento significativo da proliferação celular quando comparado ao controle negativo (DMEM 0,1% SFB). Este aumento da proliferação celular foi significativo se comparado aos controles positivos, DMEM 20% SFB e outros mitógenos como FGF 20 ng/mL e VEGF 25 ng/mL. Concentrações na faixa de 200 e 500 nM de botropasina resultaram em uma inibição dose-dependente da proliferação, as mesmas concentrações que foram estimulatórias no tratamento com os domínios DC, indicando baixa proliferação celular associada ao efeito tóxico via proteólise pelo domínio catalítico.

Na figura 13B, os peptídeos Ca III e HCR aumentaram significativamente a proliferação celular em comparação ao controle sem tratamento, entretanto o peptídeo Ca II não mostrou proliferação significativa. Ação em concentrações baixas são características dos fatores de crescimento, por isso os peptídeos serão avaliados em baixas concentrações nos próximos ensaios.

Figura 13 - Proliferação celular



Gráficos representando a quantificação da proliferação celular por incorporação de BrdU após tratamento com as proteínas (A) Bt, domínios DC e (B) peptídeos Ca II, Ca III e HCR. Células sincronizadas na fase G0/G1 do ciclo celular foram tratadas com Bt, DC, Ca II, Ca III e HCR nas diferentes concentrações, após 10 h foi adicionado o BrdU e incubado por mais 14 h. A reação foi parada, adicionado o anti-BrdU e feita a leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de 370 e 492 nm. Os asteriscos representam as diferenças significativas entre os tratamentos em relação ao controle negativo 0,1% SFB (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$).

4.5.2 Migração celular

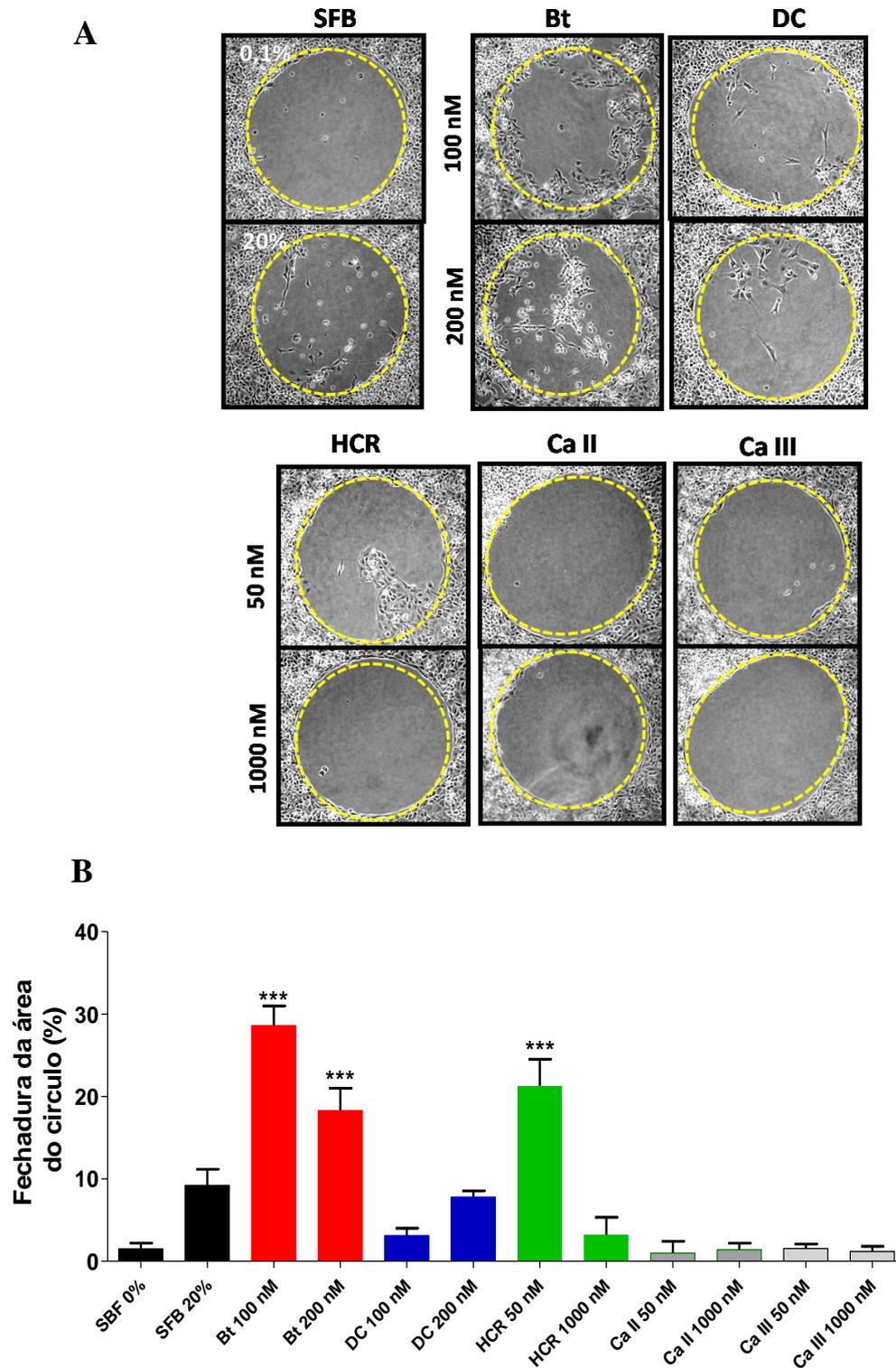
4.5.2.1 Fechamento de ferida

A migração celular avaliada pelo *Radius cell migration assay*, mostrou que os tratamentos com Bt 100 nM, Bt 200 nM e peptídeo HCR 50 nM induziram migração significativa das células HUVEC-CS em $28,6 \pm 4,1\%$, $18,3 \pm 2,7\%$ e $21,3 \pm 3,23\%$ respectivamente, em comparação ao tratamento controle negativo SFB $0,1\%$ ($1,7 \pm 0,8\%$) após 24 h de tratamento (Figura 14 A, B). A migração em resposta ao estímulo com a Bt 100 e 200 nM foram maiores que o controle positivo SFB 20% ($9,21 \pm 1,9\%$). No entanto, nos tratamentos com Bt foi observado células com perda de aderência ao substrato de maneira tempo dose dependente, consequentemente concentrações menores ou igual a Bt 100 nM serão avaliadas nos próximos experimentos.

Os tratamentos com a proteína DC, e peptídeos Ca II e Ca III, não apresentaram migração celular significativa nas concentrações de 50 nM e 1000 nM.

Esta primeira avaliação da migração mostrou que Bt 100 nM e HCR 50 nM induzem migração celular significativa na célula HUVEC-CS, mas concentrações menores devem ser avaliadas no tratamento com Bt.

Figura 14 - Migração celular: Ensaio de ferida por *RadiusAssay*.

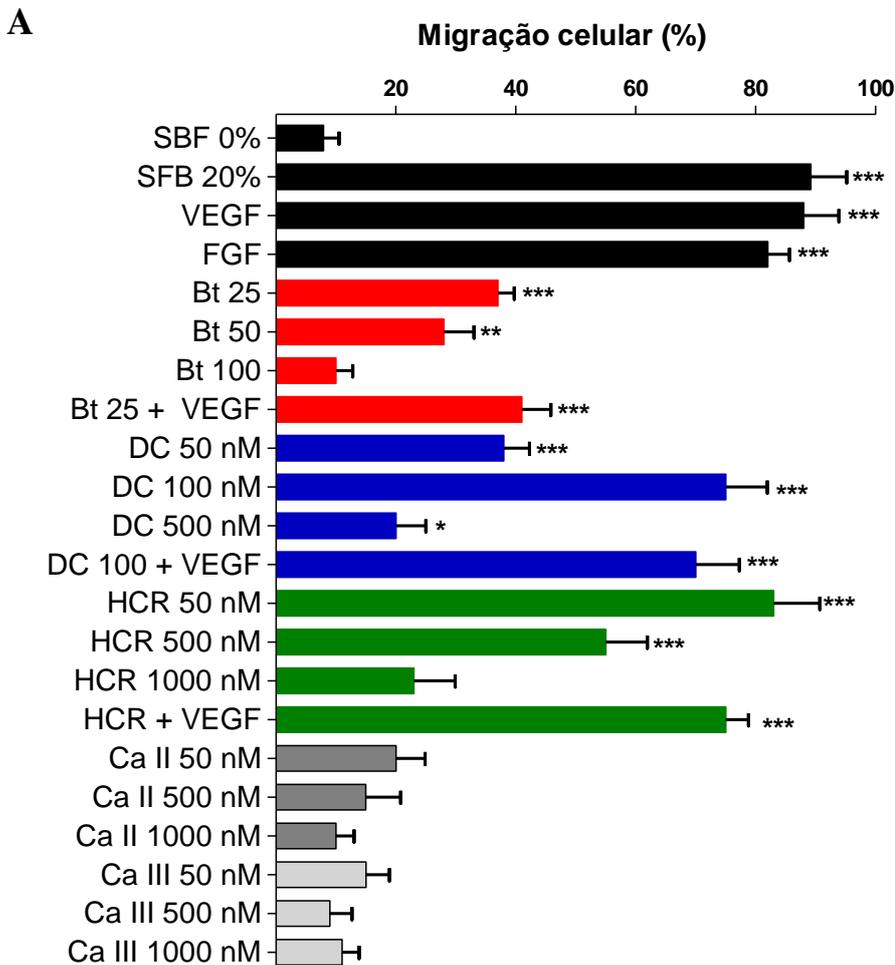


(A) Fotomicrografias representativas obtidas em microscópio invertido de contraste de fase e (B) gráfico da quantificação da migração das células HUVEC-CS no modelo de ferida celular “Radius assay” após 24 h de tratamento com as proteínas Bt, DC e peptídeos HCR, Ca II e Ca III. Aumento de 40X. Dados expressos em média da porcentagem \pm DP em razão à área circular inicial livre, $n=2$.

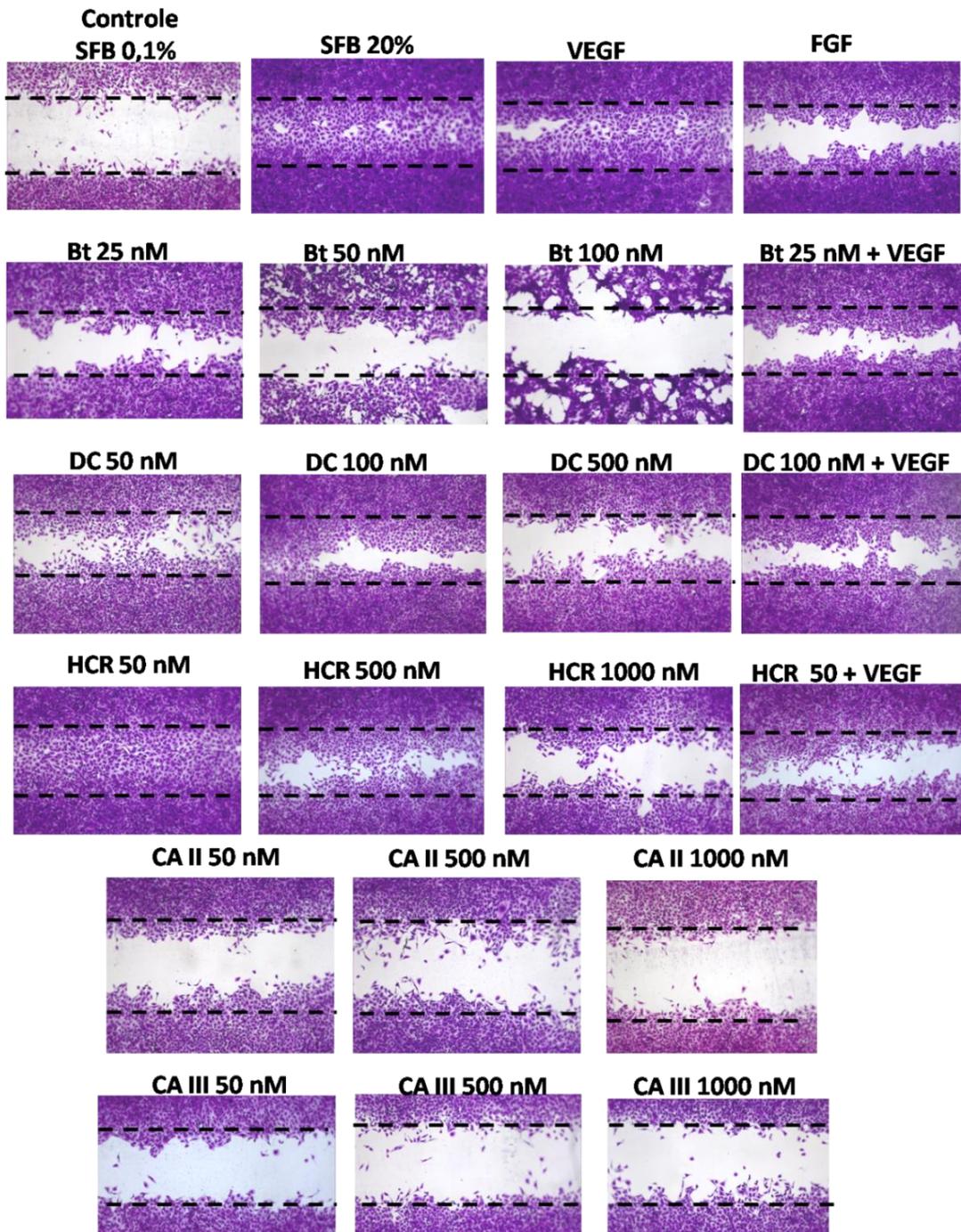
4.5.2.2 Fechamento de ferida em superfície revestida com colágeno IV

A quantificação da migração (Figura 15 A) mostrou que os tratamentos HCR 50 nM, DC 100 nM e Bt 25 nM, aumentaram de forma significativa a migração celular, cobrindo $83 \pm 7,68 \%$, $65 \pm 6,9 \%$ e $37 \pm 2,7 \%$ da área inicial livre. A combinação destes tratamentos com o VEGF não produziu diferença significativa na migração celular comparado ao tratamento único. Os tratamentos com os peptídeos Ca II e Ca III tampouco induziram migração significativa em nenhuma das concentrações avaliadas. Os controles positivos VEGF 25 ng/mL, FGF 20 ng/mL e SFB 20% induziram 88%, 82% e 89% de migração na área livre, respectivamente, enquanto que o controle negativo 0,1% SFB induziu 7,9% de migração celular. A figura 15B mostra o perfil de migração das células endoteliais HUVEC-CS em superfície revestida com colágeno IV em resposta aos tratamentos.

Figura 15 - Migração celular em superfície de colágeno “ Well wound healing assay”



B



(A) Gráfico da quantificação e (B) fotomicrofotografias representativas da migração das células HUVECS no modelo de ferida celular “Scratch assay” em superfície revestida de colágeno IV. As células foram tratadas por 24 h com as proteínas Bt, DC e peptídeos HCR, Ca II, Ca III, e controles 0,1% SFB, 20% SFB, VEGF (25 ng/mL) e FGF (10 ng/mL). Dados expressos em média da porcentagem (%) \pm DP em razão á área retangular inicial livre, n = 3. Diferenças estatísticas representadas por asteriscos * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

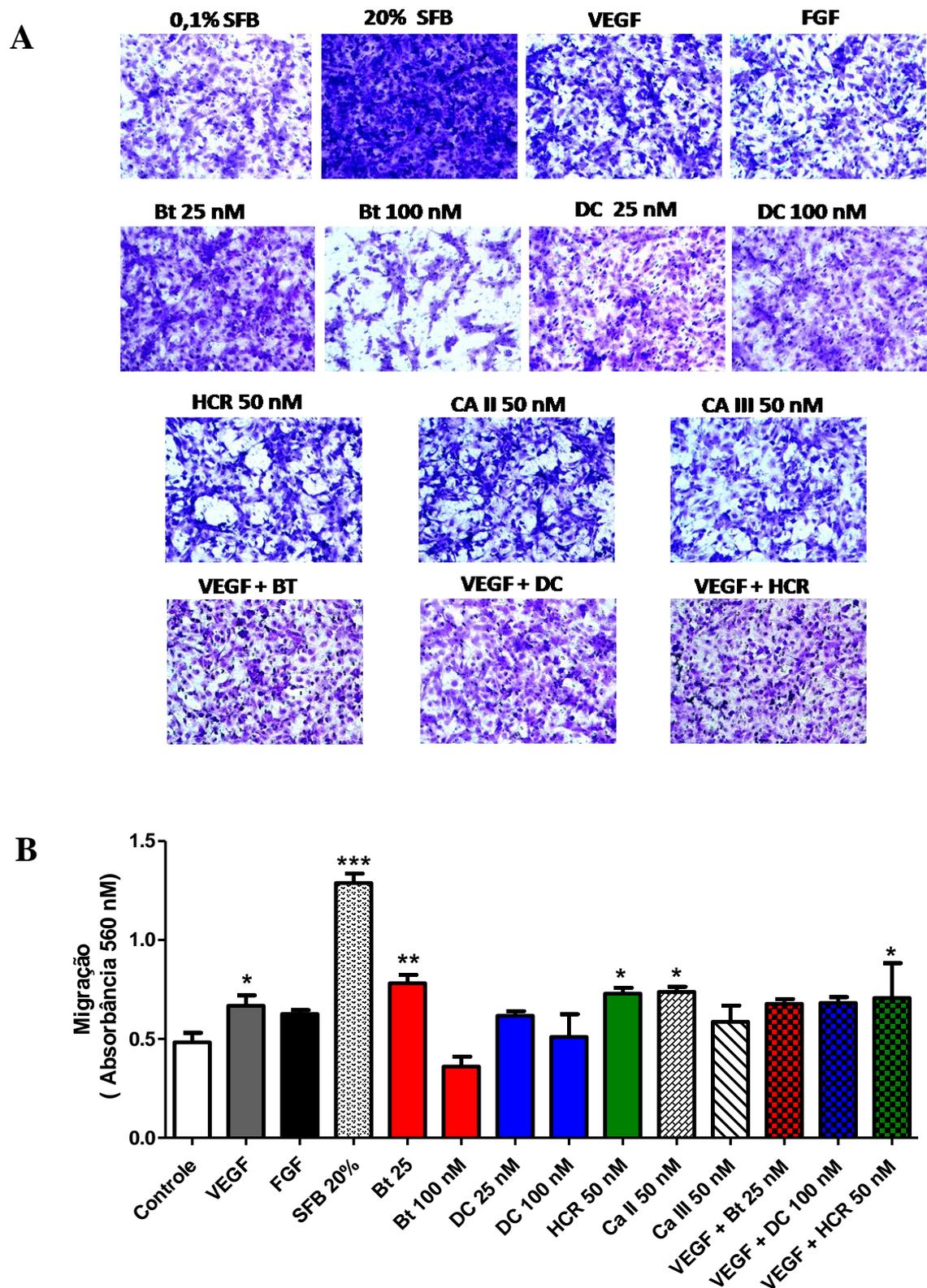
4.5.2.3 Invasão transwell em câmara de Boydem

Complementando os ensaios de migração 2D foi avaliado se os tratamentos podem atuar como fatores quimiotáticos (aplicados na câmara inferior) induzindo a migração e invasão das células HUVEC-CS que se encontram na parte superior da câmara.

A figura 16A mostra as imagens representativas das células que migraram em direção à parte inferior dos insertos em resposta aos tratamentos, que agem como fatores quimiotáticos. A quantificação colorimétrica da migração (Figura 16B) mostrou que os tratamentos únicos com Bt 25 nM, HCR 50 nM e Ca II 50 nM estimularam a migração das células HUVEC-CS. A combinação dos tratamentos Bt + VEGF, HCR + VEGF não mostraram diferenças estatísticas significativas em comparação ao tratamento único. A proteína DC, que mostrou efeito migratório significativo nos resultados anteriores, também foi considerada na combinação com VEGF, mas tampouco mostrou aumento da capacidade quimiotática em comparação ao controle. O tratamento com Bt 100 nM mostrou menor número de células invasivas, indicando que esta concentração não age como fator atraente de células. O controle SFB 20% estimulou de forma significativa a invasão celular em quase 3 vezes em comparação ao controle negativo 0,1% SFB, seguido pelo VEGF (* $P < 0,5$).

No entanto, o tratamento com a proteína Bt como fator estimulante da migração (aplicado na câmara superior diretamente nas células) mostrou que o tratamento com Bt é tão invasivo como o tratamento com SFB 20%, sendo a Bt 100 nM mais estimulador da invasão que Bt 25 nM, enquanto que o tratamento com a proteína DC não estimulou a invasão significativa ao outro lado da câmara quando aplicadas diretamente nas células. Os peptídeos não foram testados neste modelo de ensaio.

Figura 16 - Migração transwell em câmara de Boydem

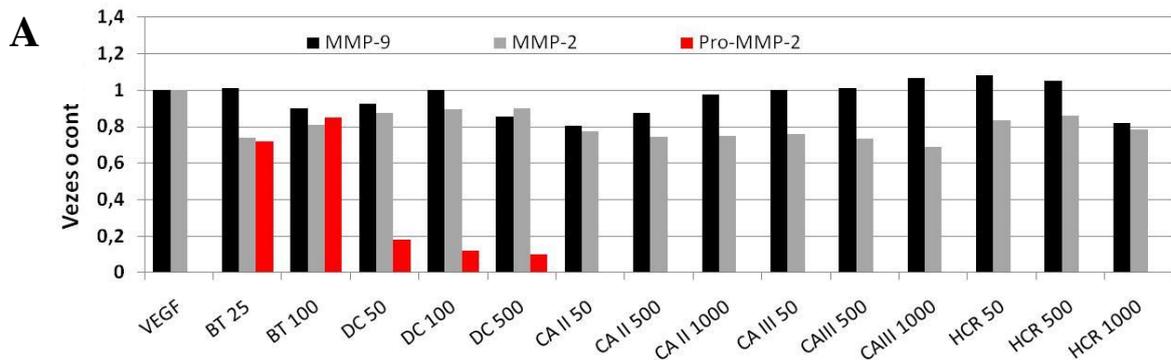


(A) Fotomicrofotografias representativas obtidas em microscópio invertido e (B) gráfico representando a quantificação da migração e invasão das células HUVEC-CS no modelo de câmara *transwell* após tratamento por 18 h com as proteínas Bt, DC e peptídeos Ca II, Ca III e HCR. Aumento de 100 X. Diferenças estatísticas foram obtidas pela comparação com o controle 0,1% SFB, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.5.3 Secreção de Metaloproteinases da Matriz (MMPs) gelatinolíticas

O zimograma das MMPs gelatinolíticas mostrou que as células HUVEC-CS secretaram tanto MMP-2 ativa (62 kDa) como MMP-9 ativa (84 kDa) em resposta aos tratamentos com as proteínas Bt, DC, e peptídeos Ca II, Ca III, HCR e VEGF (Figura 17A). Estes tratamentos induziram secreção mínima de MMPs gelatinolíticas em comparação às células tratadas com 20% SFB, como mostrado no zimograma. A quantificação das bandas da digestão (Figura 17B) mostra uma maior secreção de MMP-9 do que MMP-2 em todos os tratamentos. Além das bandas de MMPs ativas, os tratamentos com Bt (25 - 100 nM) apresentaram banda correspondente a pró-MMP-2 (72 kDa), sendo a intensidade da banda correspondente com a maior concentração de Bt.

Figura 17 - Atividade gelatinolítica por Zimografia



(A) Zimograma e (B) quantificação das bandas das enzimas gelatinolíticas de MMP-2 e MMP-9 em células HUVEC-CS tratadas com as proteínas Bt, DC e peptídeos DC, Ca II, Ca III, HCR e controles.

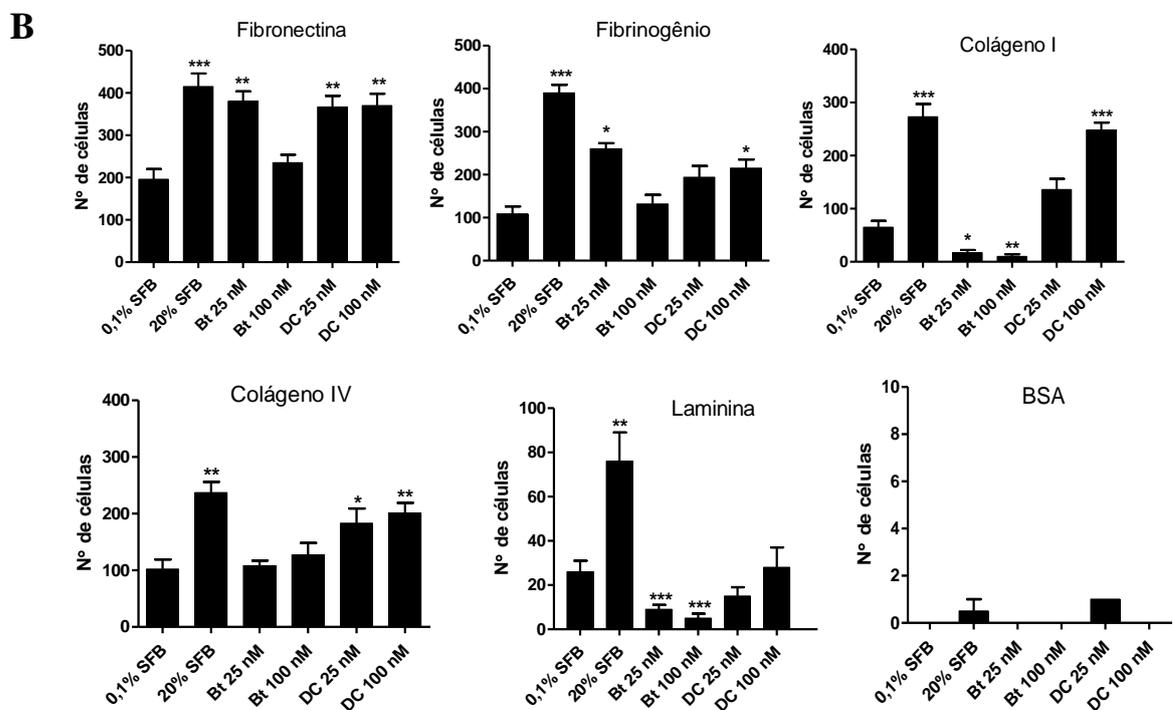
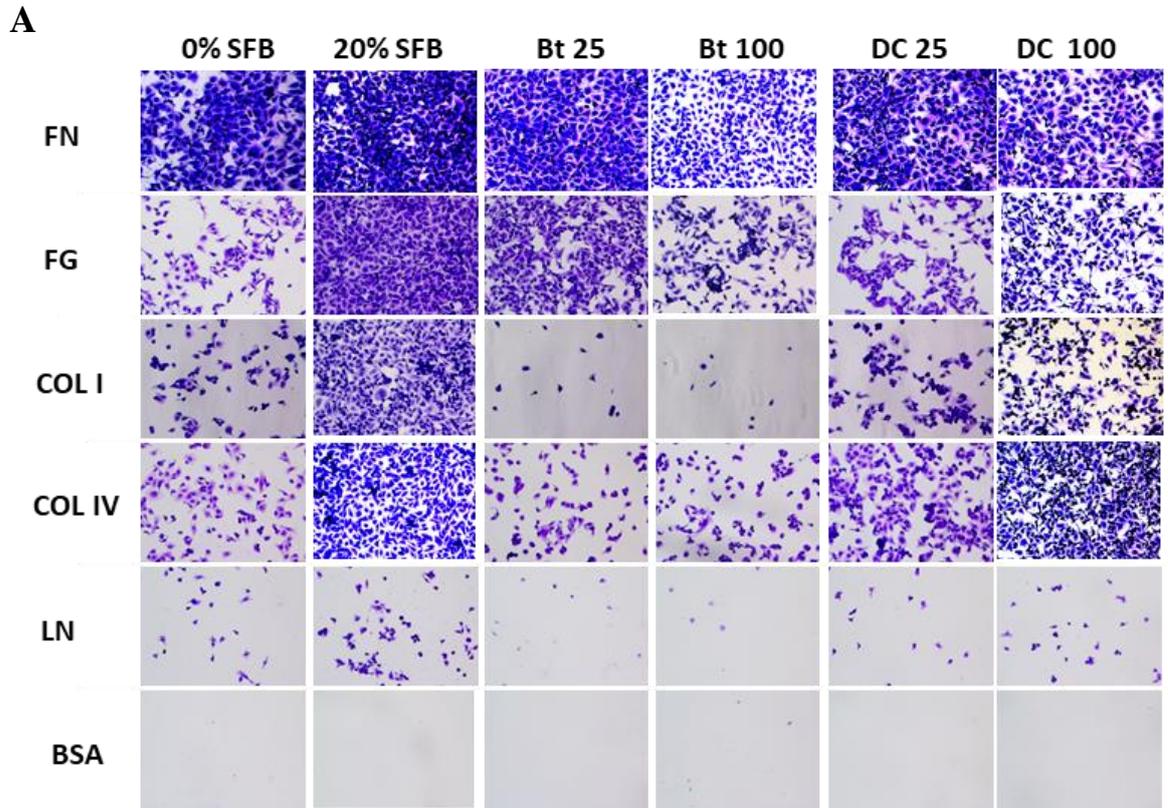
4.5.4 Adesão celular a proteínas da matriz extracelular

Durante a migração celular as células se aderem aos componentes da matriz extracelular, formando complexos com os componentes do citoesqueleto. O efeito do tratamento. A capacidade aderente das células HUVEC-CS aos componentes da MEC (fibronectina – FN, fibrinogênio – FG, colágeno I – COL I, colágeno IV – COL IV e laminina – LN) após os tratamentos com as proteínas Bt, DC e peptídeos Ca II, Ca III e HCR foi avaliada utilizando *Cytoselect ECM Cell Adesion Assay Kit*.

Como mostrado nas microfotografias da figura 18A, as células HUVEC-CS tratadas com menor concentração da proteína Bt (25 nM) possuem maior capacidade aderente aos substratos da MEC (FN, FG) em comparação ao tratamento de maior concentração (Bt 100 nM). Em contraste, as células tratadas com a maior concentração da proteína DC (100 nM) possuem maior capacidade aderente que o tratamento com menor concentração de DC (25 nM). Como mostrado na quantificação e análise por ANOVA de uma via (Figura 18B) o tratamento com Bt 100 nM diminui significativamente a adesão a COL I e LN, enquanto que a adesão a outros substratos é semelhante ao controle 0,1% SFB. O tratamento com a proteína DC 100 nM aumentou significativamente a adesão aos componentes FN, FG, COL I e COL IV em comparação ao controle 0,1% SFB. Este aumento na aderência celular mostrou um padrão de aderência semelhante as células do controle positivo tratadas com 20% SFB.

Estes resultados mostram que o tratamento com maior concentração de botropasina, indicando maior presença do domínio catalítico, apresenta provavelmente efeito no citoesqueleto da célula modificando a posterior capacidade de aderência a os componentes da MEC, no entanto a baixa concentração é estimuladora de adesão às proteínas FG e FN. Por outro lado, a presença de só os domínios DC da botropasina está associada com o aumento na adesão celular aos substratos FN, COL I e COL IV, podendo ser utilizadas concentrações médias de 100 nM.

Figura 18 - Efeito das proteínas Bt e DC na adesão das células HUVEC-CS às proteínas da matriz extracelular.



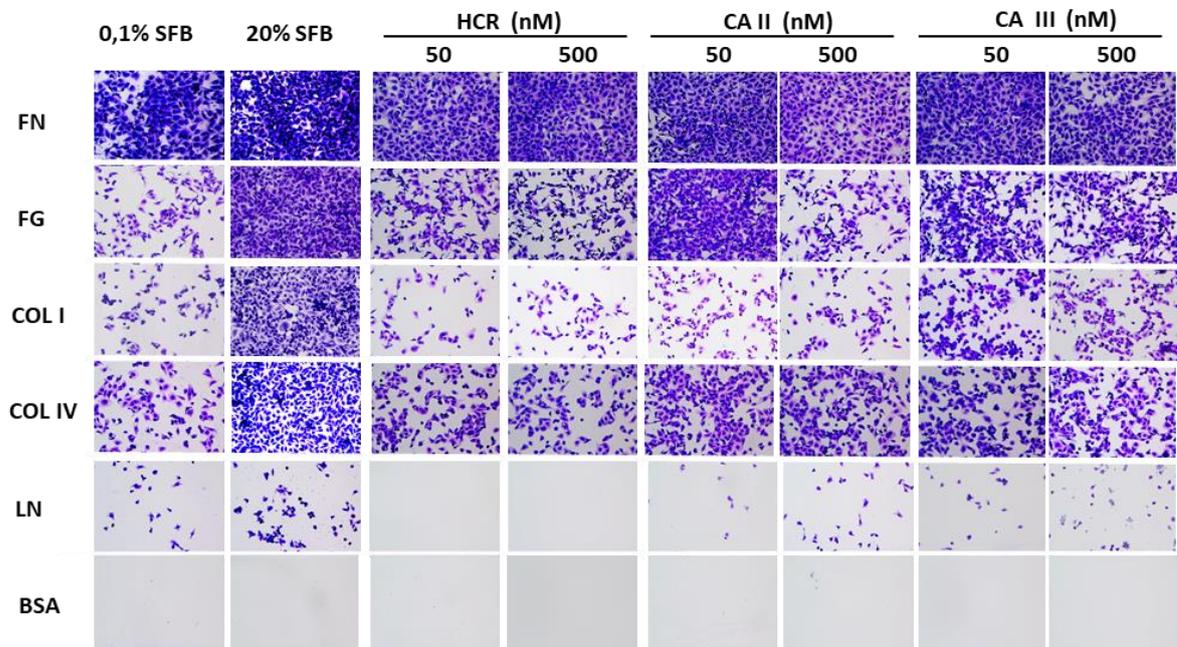
(A) Fotomicrografias e (B) gráficos representando a quantificação das células HUVEC-CS aderidas aos substratos fibronectina (FN), fibrinogênio (FG), colágeno I (COL I), colágeno IV (COL IV), laminina (LN) e BSA após tratamento com as proteínas Bt e DC. n = 2.

O tratamento das células HUVEC-CS com os peptídeos Ca II, Ca III e HCR nas concentrações de 50 e 500 nM, e posterior adesão das células à proteínas da MEC apresentaram o perfil mostrado na figura 19A. A quantificação (Figura 19B) e análise estatística por ANOVA de uma via e pós-teste de Dunnett, mostrou que os tratamentos com os peptídeos Ca II e Ca III (50 nM) aumentaram a adesão ao fibrinogênio e ao colágeno IV comparado ao controle negativo 0,1% SFB, enquanto que só o Ca III aumentou a adesão celular ao colágeno I. O tratamento com o peptídeo HCR mostrou perfil de adesão semelhante ao controle negativo, ainda com diminuição significativa na aderência ao substrato laminina. As células tratadas com 20% SFB mostraram aumento significativo na aderência a todos os substratos da MEC.

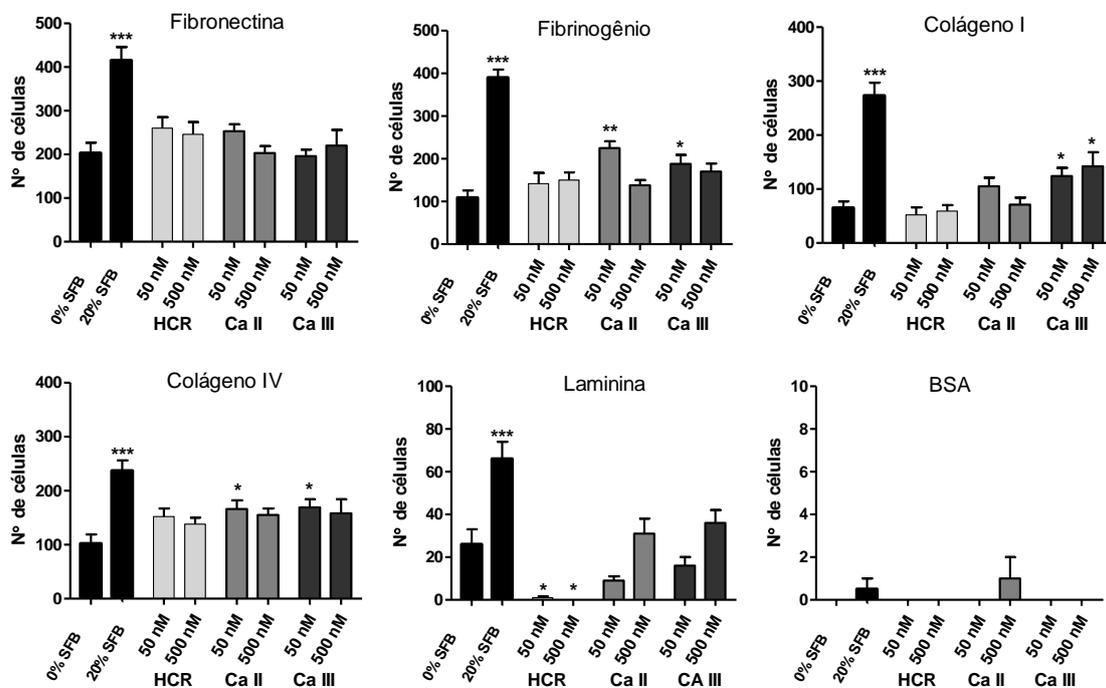
Embora o peptídeo HCR mostrasse os melhores resultados na migração celular, no ensaio de aderência celular não mostrou diferenças significativas com o controle de diluição SFB (0,1% SFB), enquanto que o tratamento com os peptídeos Ca II, Ca III aumentou a aderência a certos substratos.

Figura 19 - Efeito dos peptídeos na adesão das células HUVEC-CS às proteínas da matriz extra celular.

A



B

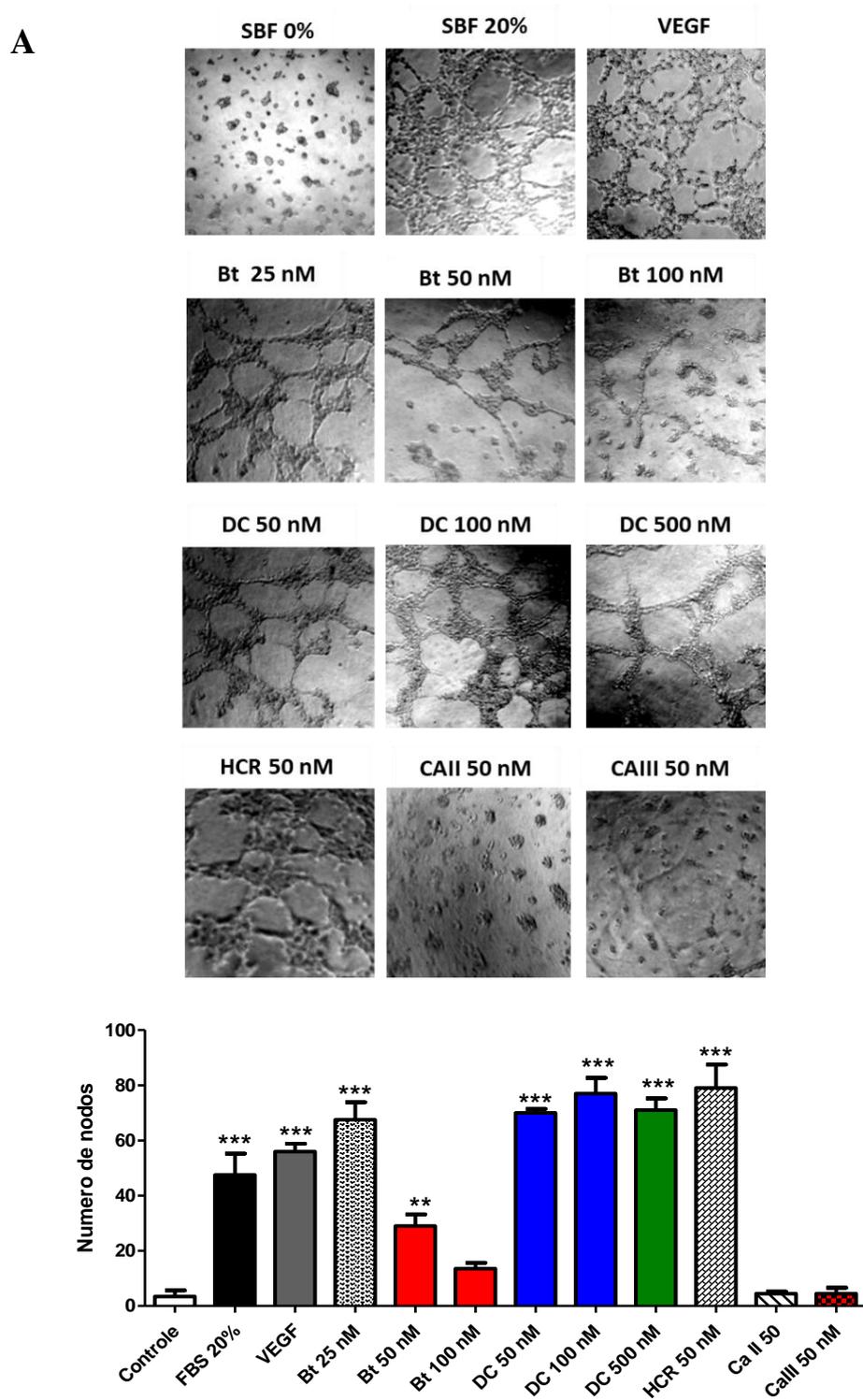


(A) Fotomicrografias e (B) gráficos representando a quantificação da adesão das células HUVEC-CS aos substratos fibronectina (FN), fibrinogênio (FG), colágeno I (COL I), colágeno IV (COL IV), laminina (LN) e BSA após tratamento com os peptídeos HCR, CA II, CA III. Dados expressos em média do número de células \pm DP, $n = 2$.

4.5.5 Formação de túbulos em Matrigel

A capacidade das células HUVEC-CS de formar túbulos *in vitro* em resposta aos tratamentos foi avaliada pelo ensaio em Matrigel. Após 8 h de incubação, as células HUVEC-CS formaram estruturas capilares tipo túbulos com junções nos tratamentos com Bt, DC e o peptídeo HCR, assim como no controle positivo SFB 20% (Figura 20A). A quantificação dos nodos dos túbulos mostra que o tratamento com Bt apresenta maior capacidade tubulogênica em menores concentrações (25 nM), enquanto que o tratamento com DC é tubulogênico em uma ampla faixa de concentração, 50, 100 e 500 nM (***) $p < 0,001$). No tratamento com os peptídeos em baixa concentração, o peptídeo HCR 50 nM é significativamente tubulogênico, enquanto que os peptídeos Ca II e Ca III não mostraram estimulação na formação de túbulos, semelhante ao controle negativo 0,1% SFB (Figura 20B).

Figura 20 - Efeito do tratamento na formação de túbulos em cultura 3D Matrigel.

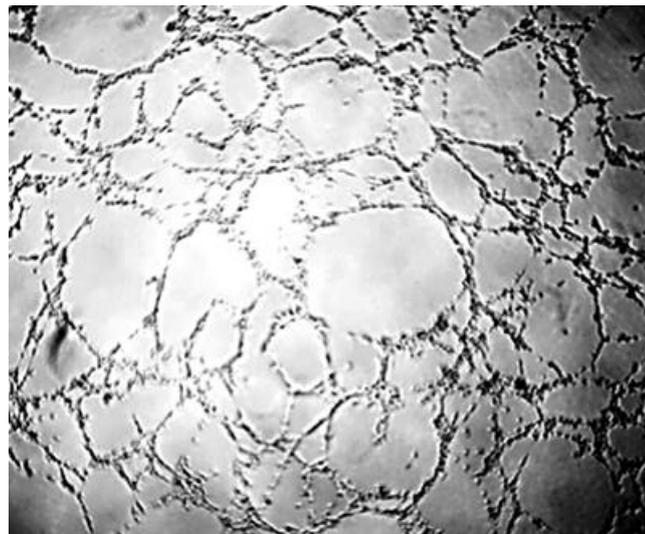


(A) Fotomicrografia em microscopia invertida de contraste de fase das células HUVEC-CS em Matrigel e (B) gráfico representando a quantificação do número de nodos dos túbulos formados em resposta aos tratamentos com as proteínas Bt, DC e peptídeos Ca II, Ca III e HCR. Aumento de 100 X. Diferenças estatísticas foram expressas em comparação ao controle *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

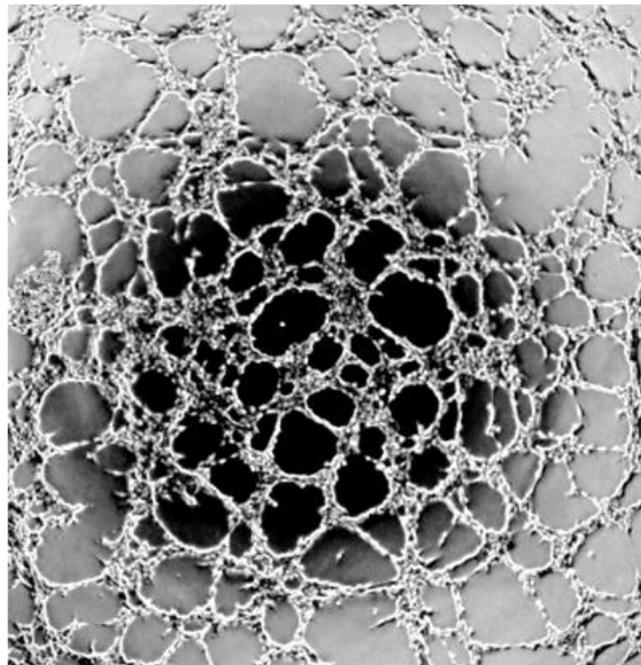
O tratamento das células em placas de cultura (2D) realizadas nos diferentes experimentos como toxicidade e proliferação celular tem mostrado a capacidade tubulogênica da botropasina nas células HUVEC-CS (Figura 21A) e nas células SVMC (Figura 21B). A formação destes túbulos é dependente do número de células e da concentração da botropasina.

Figura 21 - Fotomicrografia em microscopia invertida de contraste de fase da célula HUVEC-CS em cultura 2D tratada com botropasina.

A



B



Fotomicrografias em microscopia invertida de contraste de fase da linhagem celular (A) HUVEC-CS e (B) SVMC tratadas com botropasina. Objetiva 40X.

4.6 Vias de sinalização

Após resultados dos ensaios funcionais de proliferação, migração e tubulogênese, os tratamentos com as proteínas Bt (25 nM), DC (100 nM) e o peptídeo HCR (50 nM) foram escolhidos para caracterizar molecularmente as vias de sinalização celular envolvidas na resposta pró-angiogênica. O efeito do tratamento na expressão de proteínas foi analisado por western blot.

4.6.1 Via das MAPKinasas

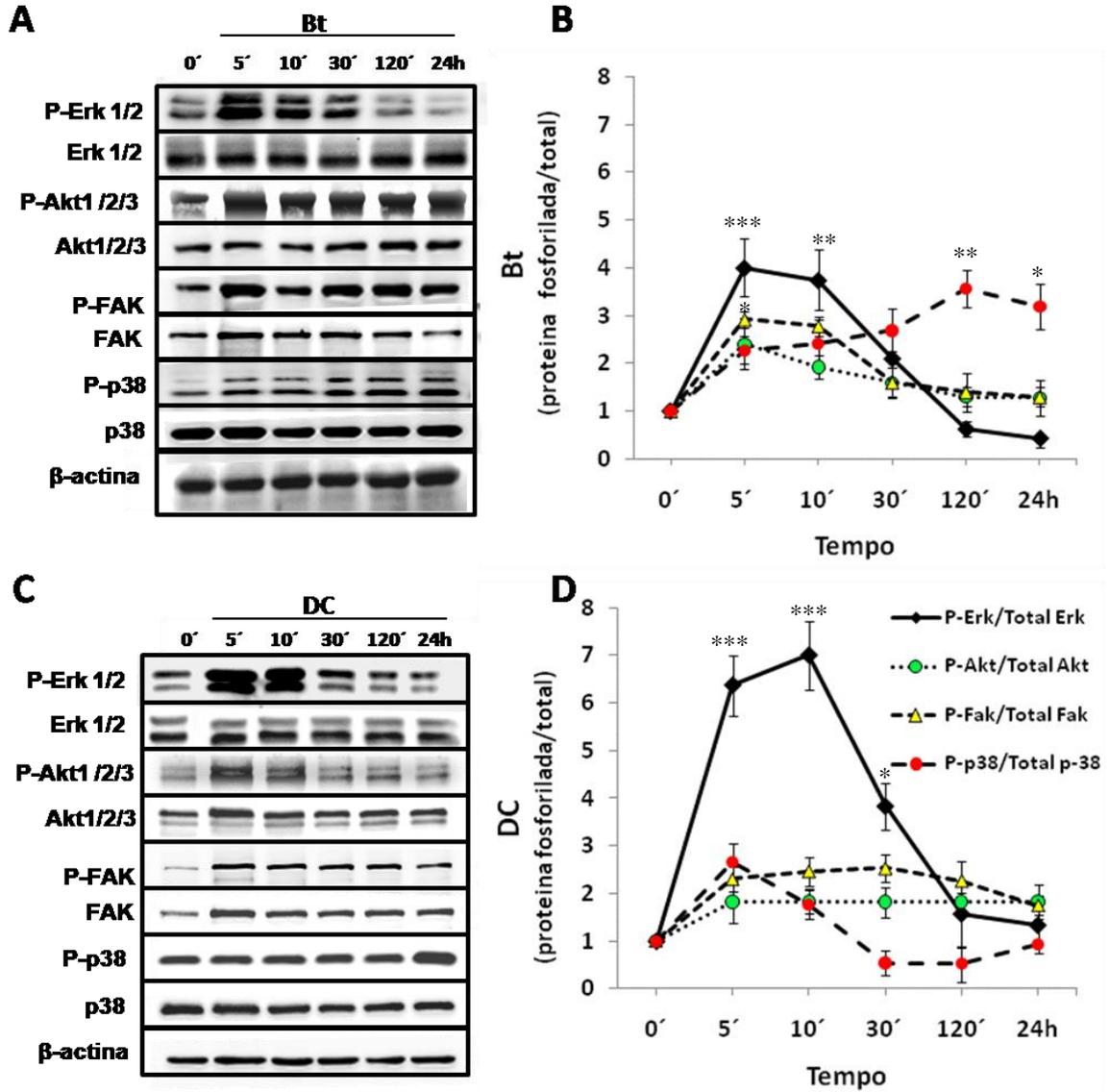
As proteínas das MAP kinases (Erk 1/2, Fak, Akt) assim como resposta a estresse e inflamação (p-38) foram analisadas por western blott.

A figura 22A e 22C mostra que células HUVEC-CS quiescentes (t=0) que foram estimuladas com Bt 25 nM e DC 100 nM aumentaram significativamente os níveis de expressão da proteína ERK fosforilada (P-Erk). A quantificação dos níveis de expressão (Figura 22B, 22D) da relação P-Erk / Erk total mostrou que os tratamentos Bt e Dc aumentaram em ~4 e ~7 vezes, respectivamente, os níveis basais de expressão após 5-10 minutos de tratamento.

Níveis menores na expressão de P-FAK/Fak (3 vezes) e P-Akt/Akt (2 vezes) foram observados em ambos os tratamentos com Bt e DC, sendo esta expressão mais prolongada em DC. O tratamento com Bt aumentou significativamente os níveis de expressão da proteína indicadora de estresse celular P-p38 (até 3 vezes) de maneira tempo dependente, enquanto que DC não mostrou aumento significativo em comparação ao controle.

Estes resultados sugerem que a Bt e DC agem como fatores mitogênicos, promovendo a proliferação da célula HUVEC-CS via a sinalização de Erk, no entanto a Bt induz estresse celular.

Figura 22 - Expressão das proteínas Erk 1/2, Akt, Fak e P38 total e fosforilada em células HUVEC-CS tratadas com as proteínas Bt e DC.

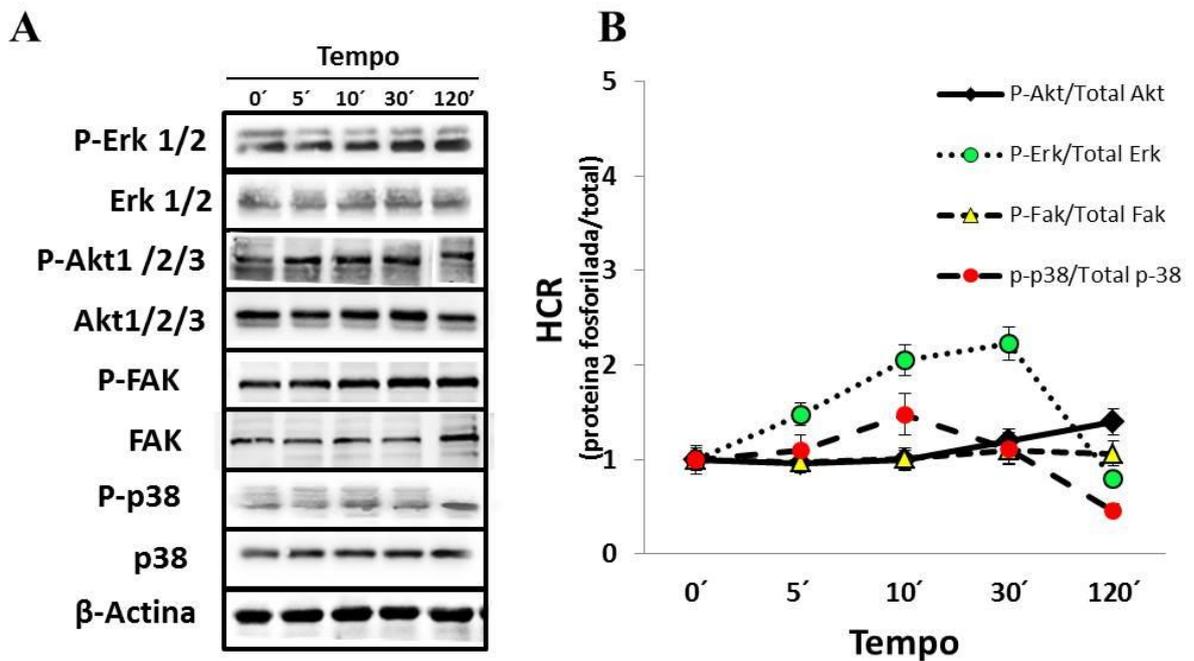


Análise por western *blot* dos níveis de expressão de Erk 1/2, Akt, Fak p38 e suas correspondentes proteínas fosforiladas, em resposta aos tratamentos com as proteínas (A) Bt 25 nM e (C) DC 100 nM. A expressão de actina foi utilizada como controle. (B e D) Gráficos representativos da quantificação da relação: proteína fosforilada/proteína total dos tratamentos por 5, 10, 30, 120 minutos e 24h, e normalização em relação ao controle não tratado ($t=0$). Dados apresentados são expressos como média \pm DP ($n = 3$). Diferenças estatísticas * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ obtidas em comparação ao controle não tratado.

O tratamento com o peptídeo HCR não mostrou significativa fosforilação das proteínas MAP Kinasas, aumentando em 2 vezes a fosforilação de Erk, enquanto que as outras proteínas Fak, Akt, p38 se mantiveram com mínimas variações (Figura 23A e 23B).

Fenotipicamente os tratamentos com as proteínas Bt, DC e o peptídeo HCR promovem os mesmos eventos centrais da angiogênese (proliferação, migração, secreção de MMPs e adesão), no entanto a comparação dos resultados de sinalização celular sugere que molecularmente o peptídeo HCR age de forma diferente das proteínas. A estrutura linear do peptídeo e a ligação HCR-FIT-C mostra que o peptídeo ingressa no citoplasma, onde provavelmente sinaliza com as proteínas, enquanto que a Bt e DC sinalizam na superfície da célula pelas integrinas.

Figura 23 - Expressão das proteínas Erk 1/2, Akt, Fak e P38 total e fosforilada em células HUVEC-CS tratadas com o peptídeo HCR.

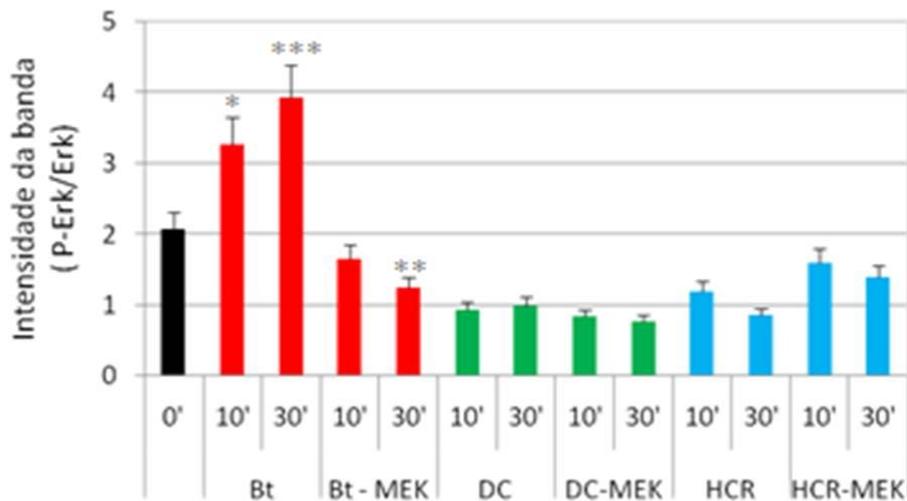
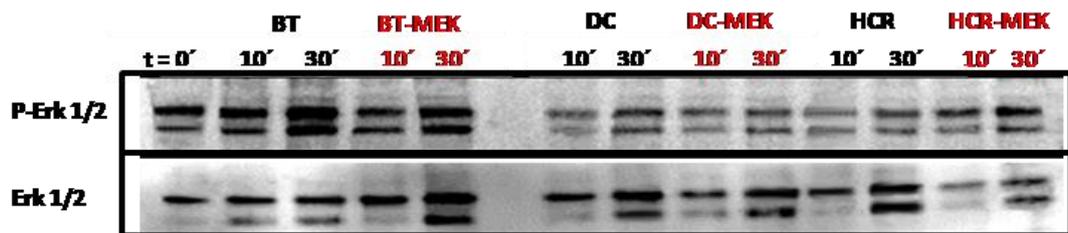


(A) Análise por western blot e (B) gráfico normalizado representativo da quantificação dos níveis de expressão fosforilada/proteína total das proteínas Erk 1/2, Akt, Fak, p38 em resposta aos tratamentos com o peptídeo HCR 50 nM por 5, 10, 30, 120 minutos. Dados apresentados são expressos como média \pm DP (n = 3). Diferenças estatísticas * p < 0,05, ** p < 0,01 obtidas em comparação ao controle não tratado.

4.6.2 Efeito da inibição do MEK/ERK U0126

Para verificar se a via de sinalização de ERK é a responsável pela proliferação e migração celular, as células HUVEC-CS foram pré-tratadas com o inibidor de MEK U0126 seguido dos tratamentos com Bt, DC e HCR, e comparadas com o tratamento sem inibidor. A quantificação dos níveis de expressão das proteínas P-Erk 1/2/ Erk 1/2 total, mostra que o tratamento com Bt diminuiu a expressão das proteínas fosforiladas Erk 1/2, enquanto que os tratamentos DC e HCR não mostraram diferenças entre os tratamentos com ou sem inibidor de Erk (Figura 24).

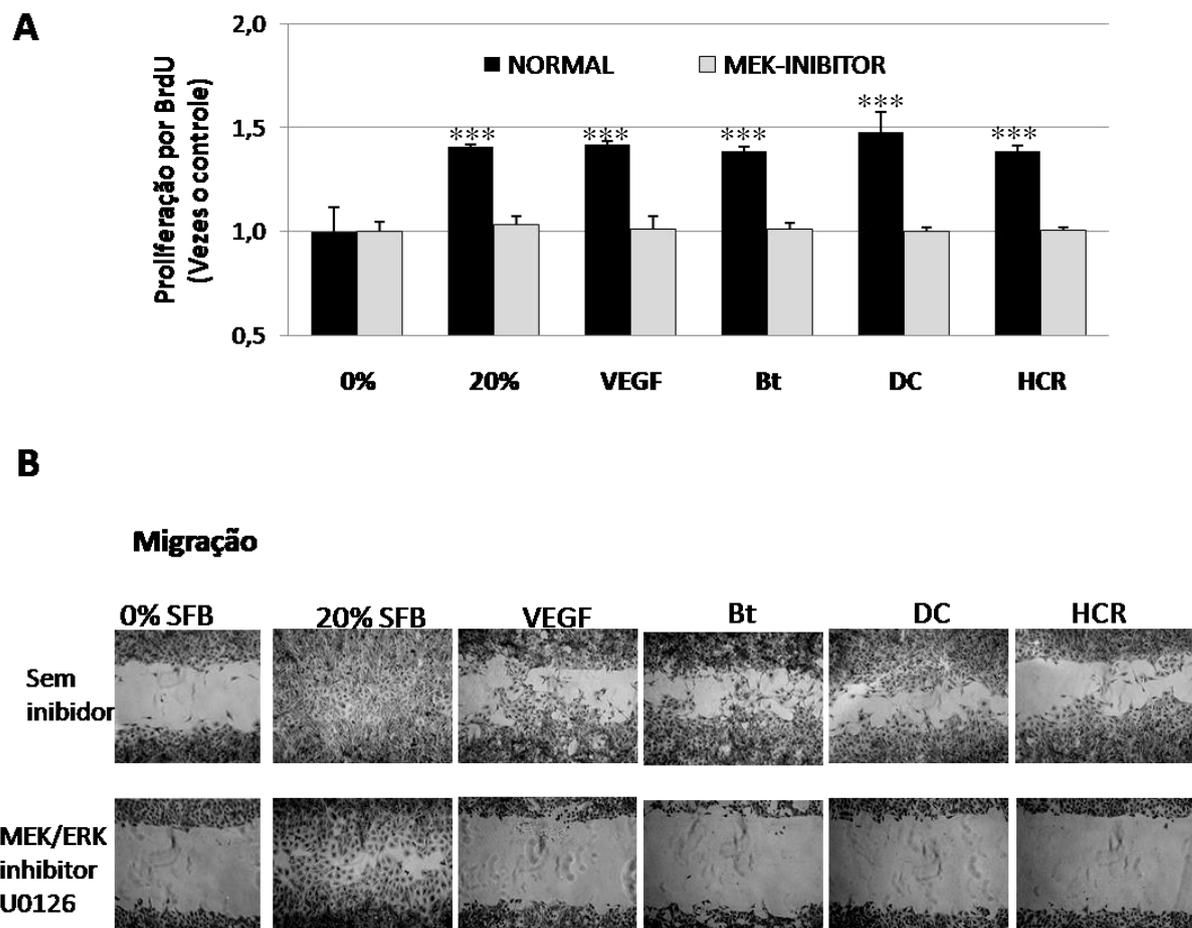
Figura 24 - Efeito do inibidor MEK/ERK U0126 nas células HUVEC-CS tratadas com as proteínas Bt, DC e o peptídeo HCR.



(A) Western blot e (B) gráfico representativo da relação proteína fosforilada/proteína total quantificação da expressão de P-ERK e Erk nas células HUVEC-CS pré-tratadas com ou sem inibidor U0126 e Bt, DC e HCR por 10 e 30 m. Os dados foram expressos como média \pm DP de dois experimentos independentes.

No entanto, o pré-tratamento das células com o inibidor U0126 mostrou a inibição da proliferação (Figura 25A) e migração celular (Figura 25B) em resposta aos tratamentos Bt, DC, HCR e controle VEGF. No tratamento com SFB 20%, o inibidor U0126 conseguiu inibir a proliferação celular mas não a migração celular, observando-se células migrando em menor quantidade que sem inibidor.

Figura 25 - Efeito do inibidor MEK/ERK U0126 na proliferação e migração.



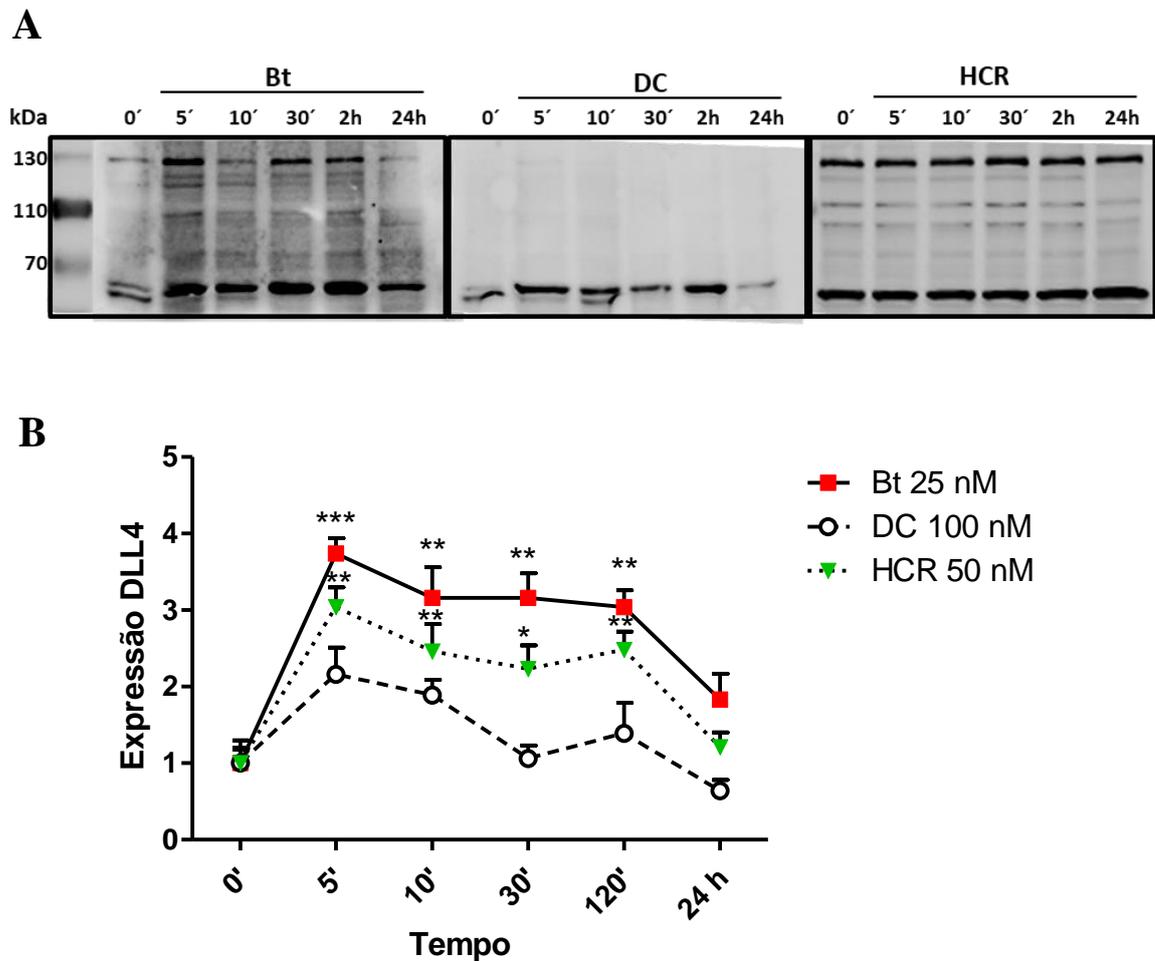
(A) Gráfico normalizado representativo da quantificação da proliferação celular por BrdU e (B) fotomicrografia em microscopia invertida de contraste de fase da migração das células HUVEC-CS com ou sem inibidor de Erk U0126. Células HUVECS sincronizadas no ciclo celular foram tratadas com Bt 50 nM, DC 100 nM, HCR 50 nM, VEGF 25 ng/mL, SFB 20% e SFB 0,1 com ou sem inibidor MEK/ERK U0126, após 10 h foi adicionado o BrdU e incubado por mais 14 h, enquanto que a migração foi avaliada após 24 h. Os asteriscos representam as diferenças significativas entre os tratamentos em relação ao controle negativo 0,1% SFB (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$). Aumento 40X.

4.6.3 Expressão de DLL4 da via de sinalização de Noth

Na angiogênese as células endoteliais da ponta expressam o ligante DLL4 para inibir a proliferação das células vizinhas, ativando a via de sinalização de Notch.

As células HUVEC-CS tratadas com as proteínas Bt 25 nM, DC 100 nM e o peptídeo HCR 50 nM expressaram o ligante DLL4 (64 kDa), no entanto, os tratamentos com Bt e HCR também expressaram os dímeros do DLL4 (128 KDa) tal como mostrado na figura 26A. A quantificação do DLL4 mostra que o tratamento com Bt e HCR aumentam a expressão e formação de dímeros do ligante DLL4 comparado ao tratamento DC (Figura 26B).

Figura 26 - Expressão de DLL4 em células HUVEC-CS tratadas com as proteínas Bt, DC e o peptídeo HCR

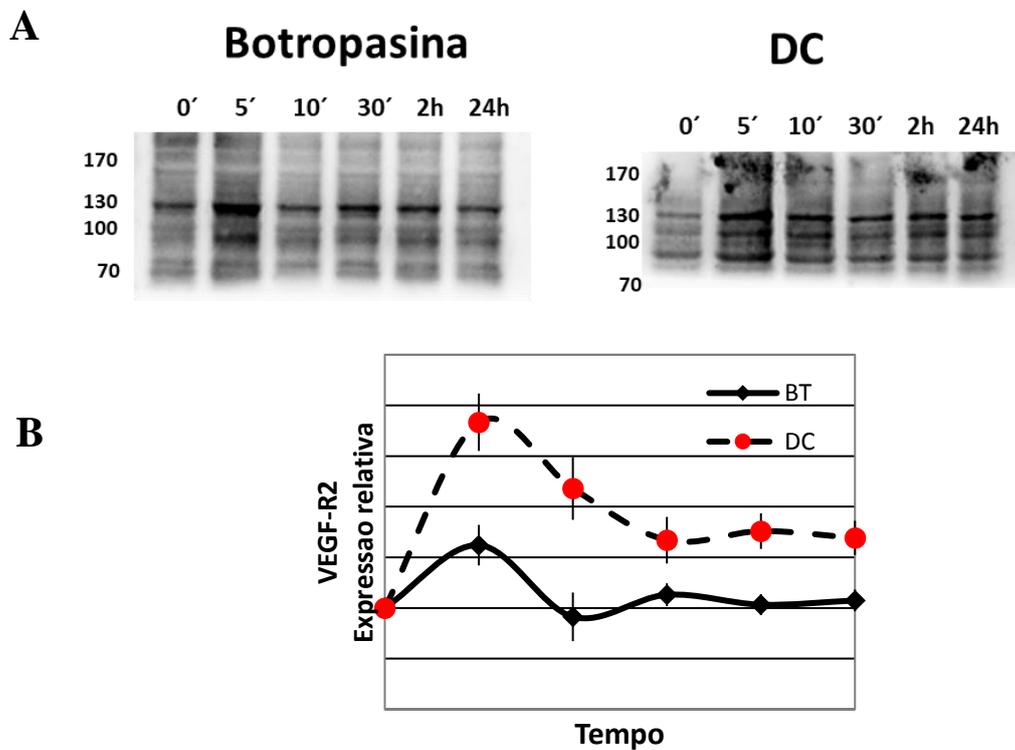


(A) Análise por western blot da expressão de proteína DLL4 (64 kDa) após tratamentos por 5, 10, 30 minutos, 2 e 24 horas. (B) Gráfico normalizado representativo da quantificação dos níveis de expressão da proteína DLL4.

4.6.4 Expressão do receptor 2 VEGF

A quantificação da expressão do VEGF-R2 nas células HUVEC-CS mostra um aumento significativo após 5 minutos de tratamento com Bt 25 nM e diminuindo aos níveis basais nos tempos posteriores, enquanto que o tratamento com DC 100 nM aumenta significativamente em comparação ao controle t=0 (Figura 27). Provavelmente as proteínas Bt e DC apresentam afinidade pelo anticorpo aumentando a especificidade do anticorpo, resultando em uma maior intensidade, mas não exercem um efeito sinalizador sustentável.

Figura 27 - Expressão do VEGF-R2 em células tratadas com Bt e DC.

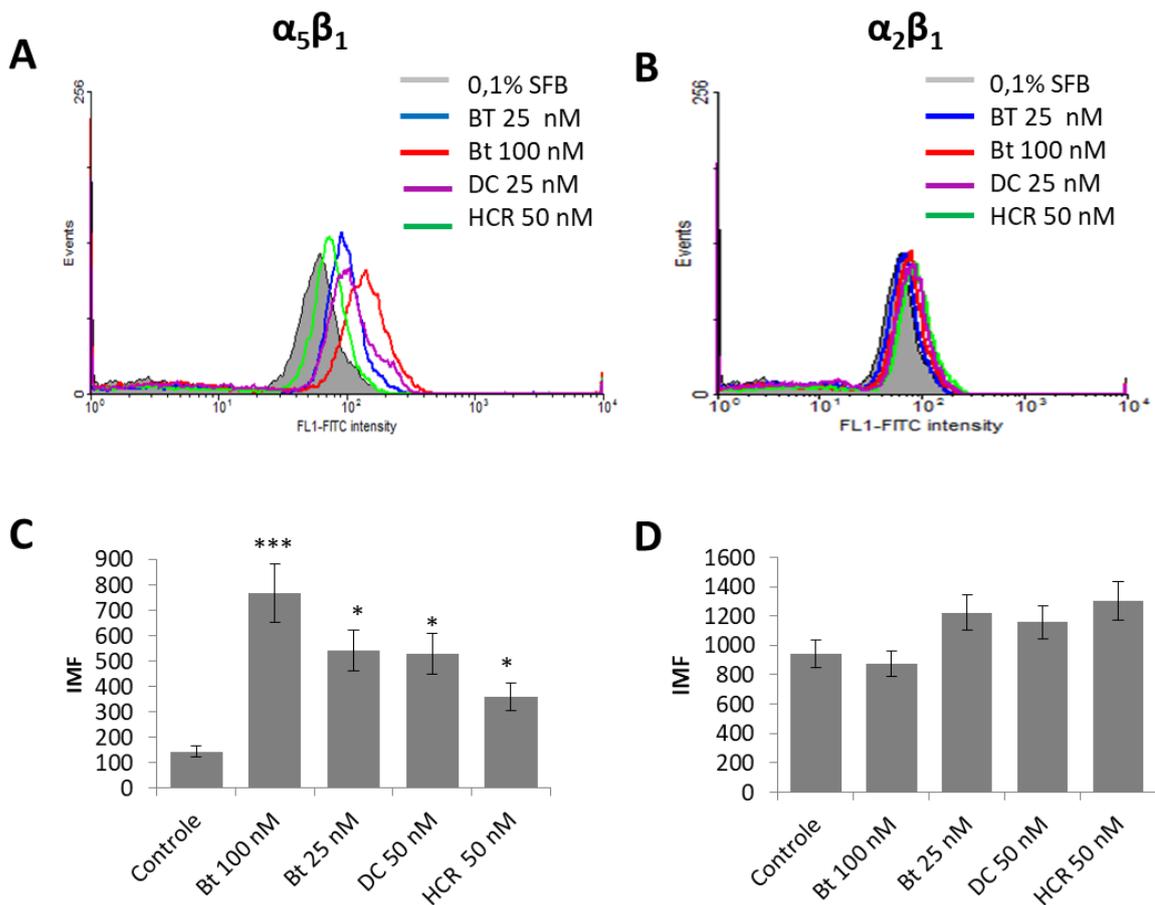


(A) Análise por western *blotting* e (B) gráfico representativo da quantificação dos níveis de expressão de VEGF-R2 e após tratamento por 5, 10, 30 minutos, 2 e 24 horas com Bt 25 nM e DC 100 nM.

4.7 Expressão de integrinas

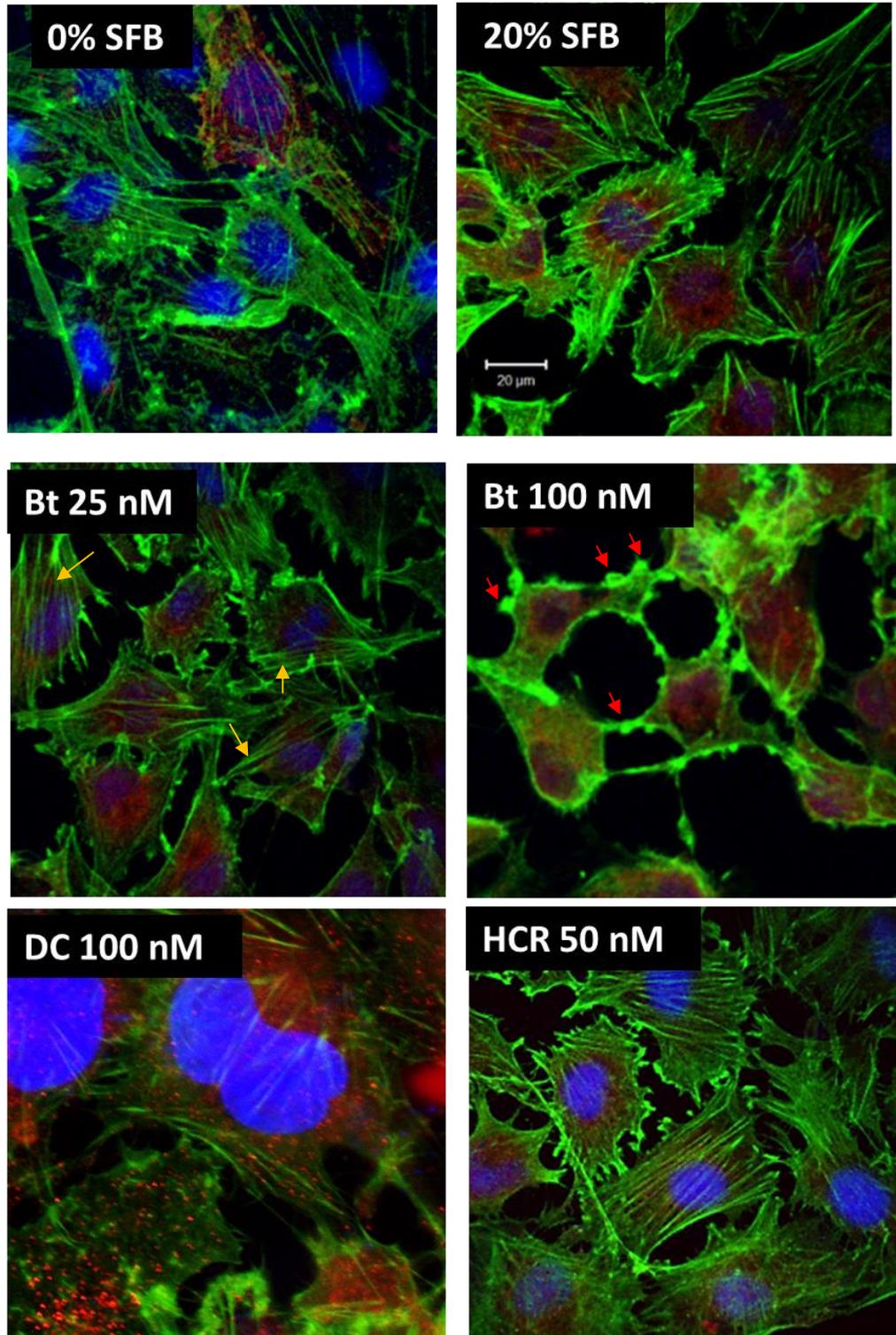
Os tratamentos com as proteínas Bt, DC e o peptídeo HCR induziram significativamente a expressão da integrina $\alpha_5\beta_1$ (Figura 28 A, C), sendo mais expressa pelo tratamento Bt 100 nM. Na figura 29 observase a expressão da integrina $\alpha_5\beta_1$ (vermelho) nas células aderentes HUVEC-CS (DC e HCR, Bt 25 nM) como nas células em retração do citoplasma (Bt 100 nM). A quantificação da integrina $\alpha_2\beta_1$ (Figura 28 B, D) não mostrou diferenças entre os tratamentos e o controle 0,1% SFB, mas na imunofluorescencia é observado uma forte expressão em todos os tratamentos (Figura 30).

Figura 28 - Expressão das integrinas $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_2\beta_1$ por citometria de fluxo.



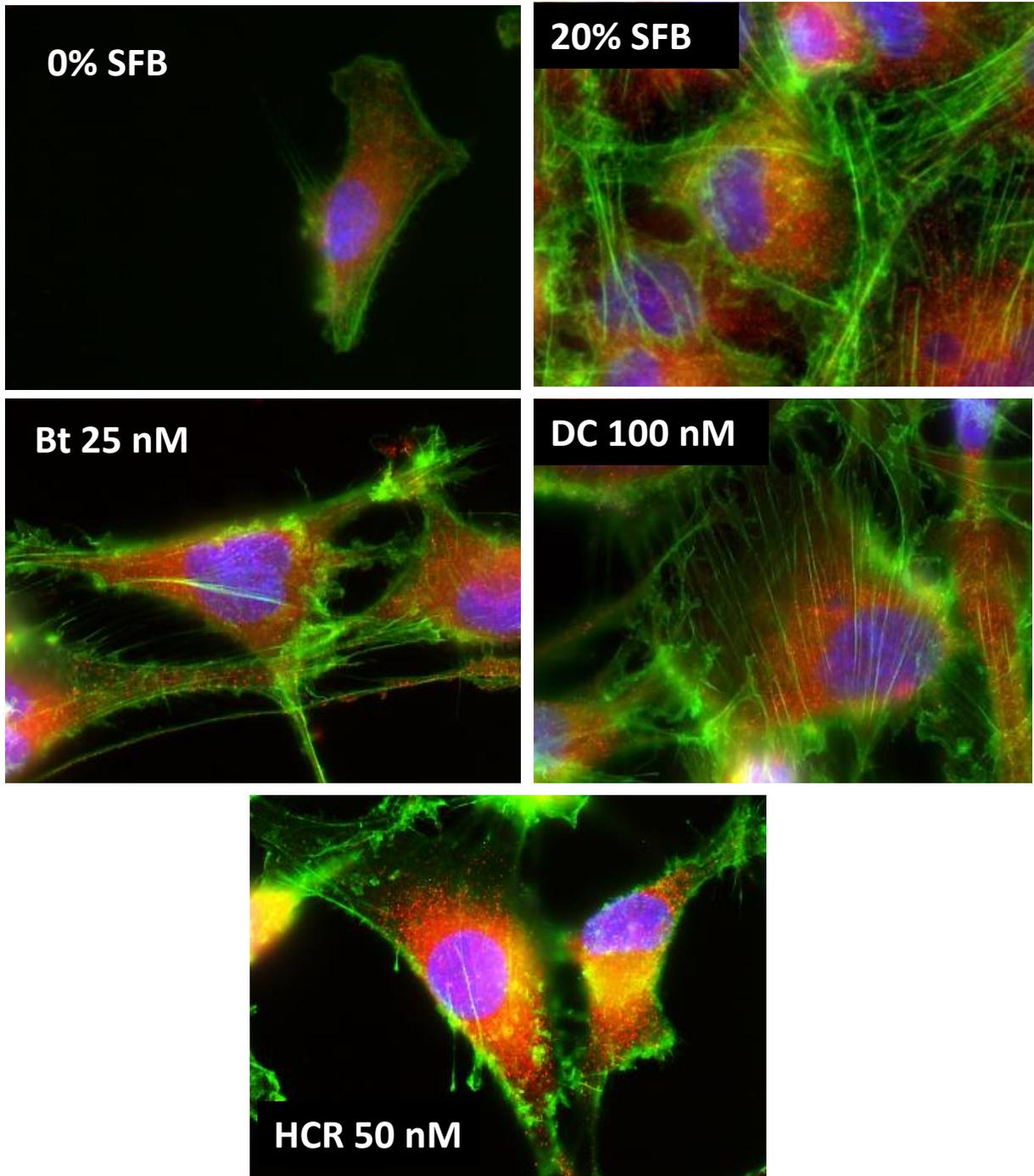
(A, B) Histogramas representativos e (C, D) gráfico representativo da quantificação da intensidade media de fluorescência das integrinas alfa5beta1 e alfa2beta1 expressas em células HUVEC-CS tratadas com Bt 25 nM, Bt 100 nM, DC 100 nM e HCR 50 nM, e controle 0,1% SFB durante 24 h.

Figura 29 - Fotomicrografias em microscopia com focal de varredura de células HUVEC-CS mostrando a morfologia e o padrão de distribuição da integrina $\alpha_5\beta_1$.



Fotomicrografia em microscopia com focal de varredura da célula HUVEC-CS tratada com Bt 100 nM, Bt 25 nM, DC 100 nM e HCR 50 nM. Foram marcados a expressão da integrina $\alpha_5\beta_1$ em vermelho, citoesqueleto de actina em verde e núcleo em azul. Observase aumento de podossomos nos tratamentos com Bt (seta amarela), e abundantes fibras de estresse nos tratamentos com Bt e DC.

Figura 30 - Fotomicrografia em microscopia com focal de varredura a laser de células HUVEC-CS mostrando o padrão de distribuição da integrina $\alpha_2\beta_1$.

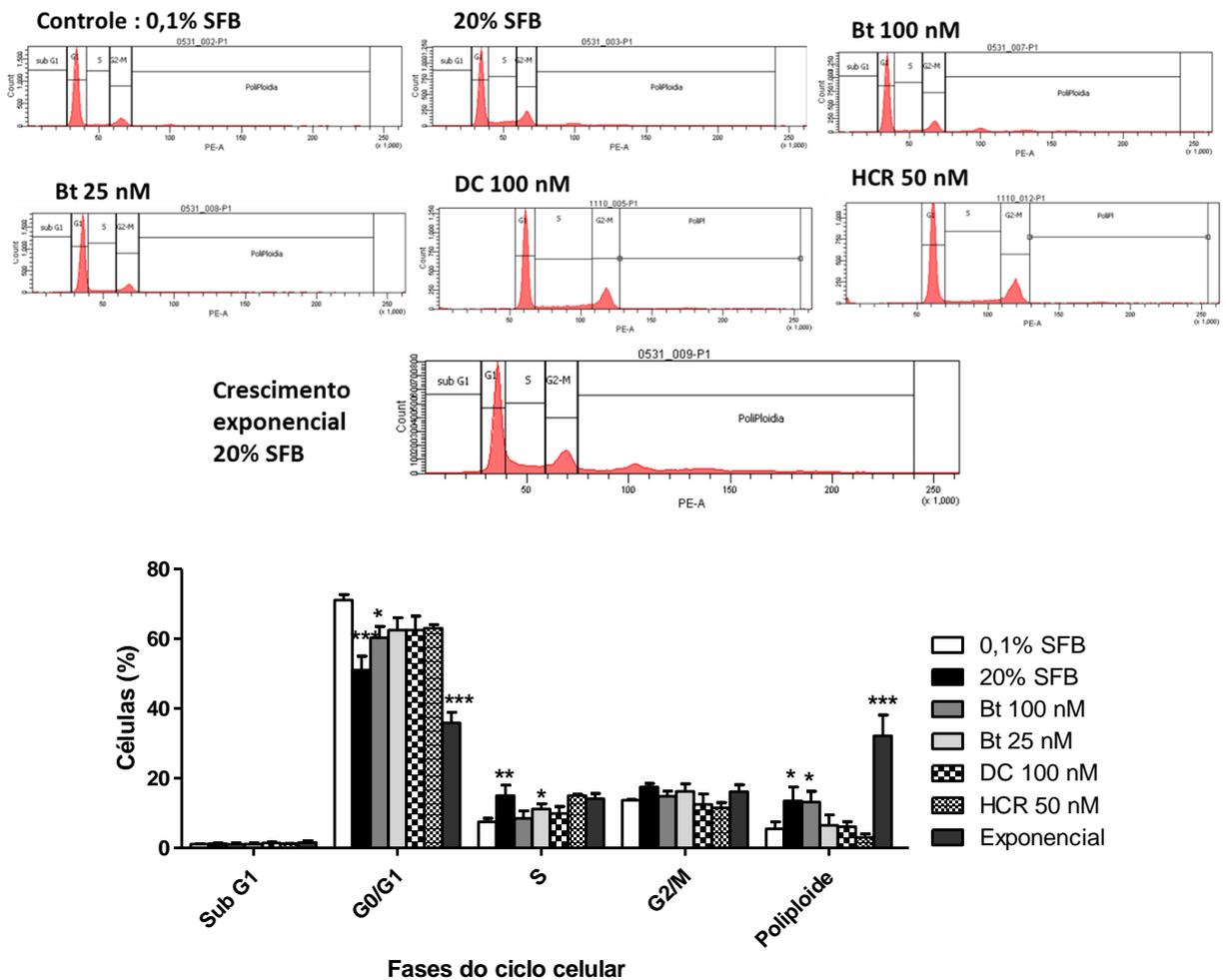


Fotomicrografia em microscopia com focal de varredura da célula HUVEC-CS tratada com Bt 25 nM, DC 100 nM e HCR 50 nM. Foram marcados a expressão da integrina $\alpha_2\beta_1$ em vermelho, citoesqueleto de actina em verde e núcleo em azul. Observase aumento a abundante expressão da integrina em todos os tratamentos.

4.8 Análise do ciclo celular

O ciclo celular mostrou aumento da fase S no tratamento com Bt 25 nM e no controle 20% SFB, em comparação ao controle 0,1% SFB (Figura 31A, 31B). As células tratadas com Bt 100 nM saíram da quiescência em G0/G1, mas não aumentaram as outras fases do ciclo celular, e sim teve um aumento significativo das células poliploides, ao igual que o controle 20% SFB. A análise do ciclo celular das células HUVEC-CS em passagem sucessiva em SFB 20% apresentou alta porcentagem de células poliploides. Os tratamentos com DC e HCR não induziram a saída no ciclo celular, sem diferenças estatísticas na progressão do ciclo em comparação ao controle negativo sem estímulo 0,1% SFB.

Figura 31 - Ciclo celular das células HUVEC-CS tratadas com Bt, DC e HCR

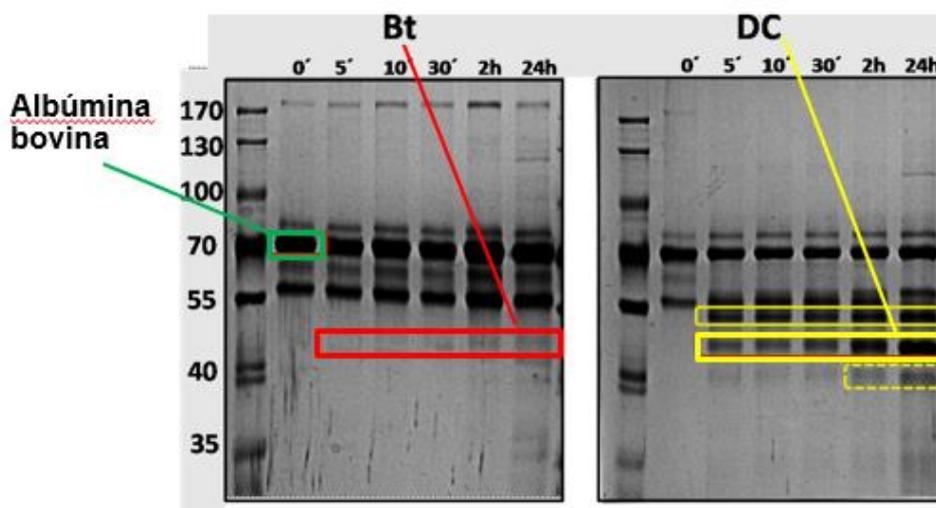


4.9 Expressão de proteínas secretadas em resposta aos tratamentos com as proteínas Bt e DC e identificadas por espectrometria de massas

O perfil da expressão de proteína no sobrenadante celular dos tratamentos com as proteínas Bt e DC (experimento de sinalização celular) foram separados por SDS-PAGE, corados com prata, observando-se a aparição de bandas tempo dependentes (figura 32) que foram identificadas por espectrometria de massas.

A análise dos dados identificou secreção da vimentina (53652 Da) no tratamento com Bt, e a secreção da proteína Kalistatina (48542 Da) no tratamento com DC. A banda da albumina serica bovina (69294 Da) foi identificada no controle do experimento (Tabela 7). Outras proteínas também foram expressas com fraca intensidade pelo que não foram para análise por espectrometria de massas.

Figura 32 - Proteínas do sobrenadante celular dos tratamentos Bt e DC separadas por SDS-PAGE e identificadas por espectrometria de massas.



As proteínas do sobrenadante das células HUVEC-CS tratadas por 5, 10, 30 minutos, 2 e 24 horas foram separadas por SDS-PAGE 8%. As proteínas mais expressas no tempo 24 h foram analisadas por Espectrometria de massas. O controle do experimento foi a banda correspondente a albumina serica bovina (verde) e as bandas expressas após 24 h nos tratamentos com Bt (vermelho) e DC (amarelo).

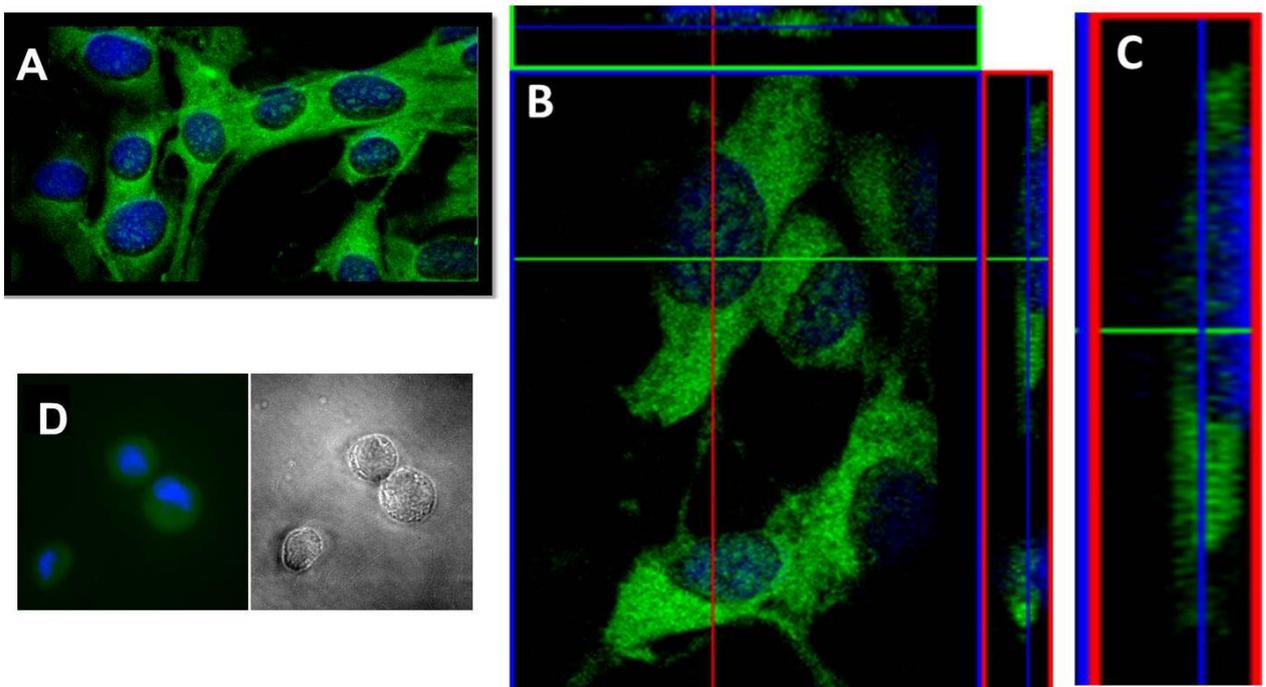
Tabela 7 - Proteínas no sobrenadante dos tratamentos Bt e DC identificadas por espectrometria de massas.

Amostra	Accesion	Massa	-10lgP	Coverage (%)
Controle	Serum albumin OS=Bos taurus	69294	306.35	80
Bt	Vimentin OS=Homo sapiens	53652	52.54	3
DC	Kallistatin OS=Homo sapiens	48542	26.07	2

4.10 Peptídeo HCR-FITC ingressa na célula HUVEC-CS

O peptídeo HCR apresentou os melhores resultados em proliferação, migração e formação de túbulos, no entanto os resultados de via de sinalização não concluíram se o peptídeo HCR está associado a fosforilação das MAPk. A síntese de um peptídeo homólogo ligado a um marcador fluorescente HCR-FITC permitiu observar que o peptídeo conjugado ingressa na célula, distribuindo-se em todo o citoplasma (Figura 32A) assim como também no núcleo da célula segundo a análise orto pela microscopia com focal (Figura 32B e 32 C). O tratamento de células em suspensão com o peptídeo HCR-FITC também mostrou a internalização do peptídeo no citoplasma celular.

Figura 33 - Células HUVEC-CS tratadas com o peptídeo HCR-FITC.



Fotomicrografia em microscopia com focal de varredura a laser da célula HUVEC-CS tratada com o peptídeo HCR-FITC 100 nM (verde) por 2 horas, evidenciando o ingresso do peptídeo no citoplasma e no núcleo (azul) da célula. Projeção de todos os canais na célula aderente (A) e na célula em suspensão (D). Projeção em ortogonal das células aderentes mostrando o peptídeo no citoplasma e no núcleo celular.

Finalmente podemos resumir os resultados na seguinte tabela, onde os diferentes tratamentos de um ensaio (proliferação, migração) recebem um score de 1 a 3 dependendo da intensidade da resposta (baixo=1, médio = 2, intenso=3) ou sem efeito = 0. A soma da pontuação de cada tratamento, nos indicara o tratamento e a concentrações que apresentaram os maiores efeitos angiogênicos

Tabela 8 - Resumo dos resultados *in vitro*

		TRATAMENTO							
		0,10% SFB	20% SFB	Bt 25 nM	Bt 100 nM	DC 100 nM	HCR 50 nM	Ca II 50 nM	Ca III 50 nM
Citotoxicidade	MTT	0	0	0	0	0	0	0	0
Proliferação	BrdU	0	3	2	1	2	2	1	1
Migração	2D	0	2		3	1	3	0	0
	2D- Col IV	0	3	1	0	2	3	0	0
	3D	0	3	2	0	1	2	1	
Zimografia	MMP-2	0	3	1	1	1	2	1	1
	MMP-9	1	3	1	1	1	1	0	0
	pro-mmp2	0	0	1	2	0	0	0	0
Adesão	Col I	1	3	0	0	2	1	1	2
	Col IV	1	3	1	1	2	1	1	1
	FN	2	3	3	1	2	2	2	2
	FG	1	3	2	1	2	1	2	2
	LMN	1	1	0	0	0	0	0	0
Tubulogênese		0	3	3	1	3	3	0	0
Sinalização	p-Erk			4		1	3		
	P-Akt			1		1	1		
	P-Fak			1		1	1		
	p-p38			2		0	0		
	DLL4			3		1	2		
	VEGF-R2			1		1			
Integrinas	$\alpha_5\beta_1$	1	2	2	3	3	3		
	$\alpha_2\beta_1$	1	1	1	1	1	1		
Podosomos		1	2	3	5	2	2		
Ciclo celular	(progressão)	1	3	2	2	2	2		
		1	3	2	3	2	2		
Inflamação				1		1			
Score total		12	44	40	26	35	38	9	9

5 DISCUSSÃO

A botropasina pertence à classe PIII das SVMPs, caracterizada por serem proteínas hemorrágicas com processamento proteolítico e inflamação dose dependentes (FOX; SERRANO, 2005). No contexto de inflamação com fator desencadeante da angiogênese, pareceu-nos pertinente estudar se a botropasina e seus domínios DC poderiam modular diretamente cada uma das transições fenotípicas do processo angiogênicos i.e., proliferação, migração, adesão e tubulogênese.

Após verificar que a botropasina e os domínios DC induzem os eventos angiogênicos *in vitro*, foi realizado uma análise *in silico* das propriedades fisicoquímicas das sequencias de regiões conservadas dos domínios DC (peptídeos Ca II, Ca III e HCR). A análise do Índice de Instabilidade (II) da sequencia de aminoácidos pelo ProtParam, onde peptídeos com valores de $II > 40$ são considerados instáveis, mostra que os três peptídeos são instáveis. Esta análise está baseada nas propriedades dos resíduos que compõem o peptídeo, podendo ser propensos a reações laterais e produção de subprodutos ao longo do tempo. Ante esta situação foi optado pela síntese dos peptídeos com os grupos tióis reduzidos e adição de um grupo –OH no final da sequência primária do peptídeo, estando a porção C-terminal na forma de ácido livre, podendo ser escrita também na forma de –COOH, e conseqüente aumento na estabilidade dos peptídeos. Os produtos foram peptídeos lineares nomeados CA II, CA III e HCR, com estabilidade maior as preditas *in silico*, e provavelmente com arranjo diferente às sequências dos resíduos na proteína nativa o que pode influenciar nas propriedades de interações. No entanto, em condições experimentais, nas quais não há a adição de agentes redutores que evitem a oxidação das pontes, pode haver alguma formação de pontes. Vale ressaltar que na botropasina as cisteínas do domínio D se encontram formando pontes dissulfeto, e podem interagir entre si ou fazer ligações com outros metais como zinco ou níquel (MUNIZ et al., 2008).

Os critérios para seleção da sequência dos peptídeos nos domínios DC é a presença de resíduos conservados nos sítios de ligação ao Ca e dos motivos ECD, contribuindo para a informação sobre os mecanismos moleculares e propriedades adesivas dos domínios DC (RAMOS, SELISTRE DE ARAUJO., 2005; MENEZES et al., 2008). O motivo ECD no domínio tipo-disintegrina (D) assim como peptídeos sintéticos contendo a sequência ECD exercem influência sobre a ação das integrinas, agindo como ligante na interação das SVMPs e ADAMs com as integrinas (KAMIGUTI et al., 1997; (MOURA-DA-SILVA et al., 1999), MARIANO DE OLIVEIRA 2003, por esse motivo os dois peptídeos CAII e CAIII foram sintetizados contendo a sequência ECD.

No desenvolvimento dos ensaios da angiogênese foi utilizada a sub-linhagem HUVEC-CS, derivada da célula endotelial humana (HUVEC-C), caracterizada por ser funcionalmente similar com a HUVEC primária (GIFFORD et al., 2004). Com a finalidade de mimetizar o microambiente vascular quiescente observado nas células endoteliais in vivo, foi padronizada a indução da quiescência celular da linhagem HUVEC-CS. A sincronização celular na fase G0/G1 foi padronizada após 48 h em 0,1% SFB, considerando que ela também sincroniza na ausência completa de SFB por 48 h. Outros estudos com esta sub-linhagem tem sincronizado com 0% SFB por 24 h (FENG; ZHANG; XING, 2012). Em nossas condições de sincronização e tratamento com 0,1% SFB por 24 h, a marcação com anexina-V/PI mostrou viabilidade celular maior a 98%. No entanto, em condições de crescimento exponencial as células HUVEC-CS mostraram poliploidia em 20% da população, indicando uma instabilidade genômica. Estudos com a célula endotelial humana ECV 304 sob-passagens sucessivas, adquirem um fenótipo transformado, podendo ser usadas em estudos de fatores fisiologicamente ativos para usos médicos (TAKAHASHI et al., 1990).

Outro fator importante a considerar foi a atividade enzimática da botropasina, já que concentrações iguais da proteína podem apresentar diferentes atividades enzimáticas dependendo das condições de armazenamento e manipulação. A observação da diminuição dos efeitos da botropasina na morfologia celular podem ser indicadores de perda da atividade enzimática. A botropasina e outras proteínas representantes da classe PIII como a jararagina e HF3 presentes no veneno de *Botrops jararaca*, sofrem processamento proteolítico, que separa os domínios tipo-disintegrina e rico em cisteína (DC) do domínio metaloproteinase (M), dependendo da temperatura na qual são armazenadas. Neste trabalho a botropasina e seus domínios DC foram purificados, e sua atividade enzimática avaliada pela digestão do fibrinogênio (qualitativa) e com substratos fluorescentes (quantitativa) mostrando alta atividade, sendo aliqüotados em pequenas quantidades (20 µL) e armazenados a -20 C até o uso.

O processo angiogênicos está dividido em três grandes passos: iniciação da resposta angiogênica, migração da célula endotelial, proliferação e formação de túbulos, e maturação da microvasculatura. Por ser uma metaloproteinase hemorrágica foi importante a avaliação da toxicidade celular, já que diferentes grupos de pesquisa têm usado concentrações maiores para o estudo do mecanismo hemorrágico ou com a finalidade de induzir morte de células tumorais. Nossa avaliação *in vitro* mostrou o uso da botropasina em concentrações não tóxicas (menores a 100 nM = 5 µg/mL), os domínios DC em ampla faixa de concentração, e os peptídeo preferentemente em baixas concentração (menor de 500 nM). As diferenças no perfil migratório

da proteína DC no ensaio de migração celular 2D - Radius assay e em superfície revestida de colágeno IV, provavelmente estão associadas á afinidade dos domínios DC pelo colágeno IV em comparação ao material sintético que é o hidrogel, mostrando que substratos diferentes fazem diferença na capacidade migratória da célula. O tratamento com Bt 100 nM migrou de maneira significativa em comparação a concentração 25 nM no ensaio de radius assay, no entanto o efeito do domínio catalítico vai promover a perda das adesões focais induzindo a perda da aderência celular. A resistência a esta perda de aderência vai modificar o citoesqueleto de actina induzindo a formação de fibras de estresse, como observado na imunofluorescência (Bt 100 nM). Estudos realizados com a jararagina em altas concentrações de 40 µg/mL (800 nM) induzem a perda da aderência à superfície celular em células endoteliais murinas tEnd (TANJONI et al., 2005) e células endoteliais humanas HUVEC (BALDO et al., 2008). A estimulação da migração está correlacionada com a fosforilação das quinases de adesão focal, associado com a sinalização das integrinas, eventos acompanhados do rearranjo do citoesqueleto de actina, com aumento da polimerização de actina e formação de processos celulares associados à mobilidade (COSTA et al., 2008).

Nos resultados de migração celular, onde o tratamento com a proteína Bt e o peptídeo HCR estimulam a migração no teste de *radius assay*, enquanto que a proteína DC e o peptídeo HCR estimulam a migração em superfície de colágeno IV, indicando como o tratamento modifica o citoesqueleto e sua interação com o substrato. A migração em câmara *transwell* mostrou que a Bt, HCR e Ca II atuam como agentes quimiotáticos estimulando a capacidade migratória e invasiva das células, no entanto a capacidade de migração e invasão da Bt é notável quando adicionada diretamente nas células, modificando o citoesqueleto de maneira dose dependente e induzindo a migração celular, enquanto que o tratamento com DC tem preferência pelo substrato de colágeno IV. Em conclusão, os tratamentos com as proteínas Bt, DC e o peptídeo HCR estimulam a migração quando aplicados diretamente na célula com dependência do substrato, e apresentam pouca atividade quimiotática. Estudos realizados com SVMPs PIII e com os domínios DC tem mostrado atividade quimiotática com aumento no rolamento de leucócitos como resultado dos efeitos inflamatórios (MOURA-DA-SILVA; BALDO, 2012). O tratamento com a proteína Bt 50-100 nM é um fator estimulante da migração (aplicado na câmara superior diretamente nas células) por agir diretamente no citoesqueleto da célula modificando sua morfologia como mostrado na IFI – sendo a Bt 100 nM mais estimulador da invasão que BT 25 nM, sugerindo que a capacidade invasiva está associada à interação da Bt com as células, apresentando cluster de adesão (podosomos). A formação de cluster de podosomos é um processo fundamental nas células endoteliais durante a angiogênese, pela

degradação da matriz extracelular, sendo estruturas chaves na migração celular (SEANO, G. et al., 2014).

As integrinas modulam a migração durante a angiogênese, estabelecendo a aderência da CE com a MEC via reconhecimento da região RGD presente em proteínas da MEC, estando envolvidas na sinalização celular e na formação de podosomos (SEANO, G. et al., 2014). Neste trabalho foi observado que os tratamentos com as proteínas BT e DC aumentaram em maior proporção a expressão da integrina $\alpha_5\beta_1$, que é o ligante a fibronectina, o que é corroborado com o significativo número de células aderidas ao substrato fibronectina nos ensaios de adesão celular. Da mesma forma, os tratamentos BT e DC mostraram aumento de células que se aderem ao fibrinogênio, onde a integrina $\alpha_5\beta_1$, conhecida como receptor de fibrinogênio, tem importância no desenvolvimento da angiogênese em tumores sólidos (SCHAFNER et al., 2013), sendo alvo de estudo na terapêutica do tumor. A fibronectina é o maior componente da MEC, sendo importante nos processos de adesão, migração e diferenciação celular nos processos de cicatrização de feridas e desenvolvimento embrionário (PANKOV, R.; YAMADA, K.M.; 2002).

Por outro lado, o tratamento com Bt, DC e HCR modulam estas características angiogênicas via a sinalização da integrina $\alpha_2\beta_1$, amplamente expressa nas CE, mas sem diferenças entre os tratamentos de CE crescidas em superfície revestida com colágeno IV.

Se sabe que a isoforma da botropasina, jararagina, se une a integrina $\alpha_2\beta_1$ das plaquetas, Neste ensaio onde os tratamentos são incubados com as células, e seguidamente são lavadas em PBS para tirar o tratamento, e ver o efeito do tratamento na expressão de integrinas e afinidade pelos diferentes substratos da MEC, nós podemos afirmar que a proteína DC além de unir-se as integrinas $\alpha_2\beta_1$, também aumentam a expressão desta integrina, observado no aumento na adesão ao colágeno IV, componente encontrado principalmente na membrana basal. Em contraste, o tratamento com BT induziu provavelmente a perda da expressão de algumas integrinas envolvidas na ligação aos substratos COL I e laminina, componentes do tecido conjuntivo e membrana basal, respectivamente, o que explicaria sua alta capacidade migratória e provavelmente com um fenótipo de célula de TEM ou transformada. Em contraste, o peptídeo HCR não apresentou afinidade por nenhuma das proteínas da MEC em comparação ao controle sem tratamento. Fibroblastos e CE tratadas com jararagina (disintegrina ECD) também aderem ao colágeno via integrina $\alpha_2\beta_1$ (ZIGRINO et al., 2002; MOURA DA SILVA et al., 2001). O fato que a integrina $\alpha_2\beta_1$ une-se ao colágeno, está implicado com a reorganização e contração, das matrizes de colágeno o que é importante nas feridas e angiogênese. No entanto, outras

integrinas como $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ devem ser avaliadas por serem as mais expressas na formação de vasos sanguíneos (SERINI, VALDEMBRI, BUSSOLINO; 2006).

A proliferação e migração promovidas pelos fatores suas modificações nos sinais de transdução alteram as funções celulares, entre elas a secreção de proteínas. A ativação das células endoteliais é o primer processo importante na angiogênese, e envolve as CE secretando proteases MMPs que degradam as diferentes proteínas da MEC, expondo sítios críticos de união a integrinas, gerando uma MEC pró migratória (SNOEK-VAN BEURDEN E VON DEN HOFF, 2005). Os tratamentos com Bt, DC e HCR mostraram migração celular significativa na superfície revestida com colágeno IV, em correlação, os sobrenadantes destes tratamentos induziram a secreção de MMP-9 e MMP-2 em proporções comparáveis ao tratamento com VEGF. Estas gelatinases, MMP-2 e MMP-9, degradam o colágeno nativo tipo IV, principal constituinte das membranas basais, e estão envolvidas na migração e invasão de células vasculares (GENERSCH et al., 2000; KRÄLING et al., 1999). Além, o tratamento com botropasina induz a clivagem de pro-MMP2, de maneira dose dependente, processo semelhante ao descrito por outras SVMPs na clivagem do pro-TNF (MOURA-DA-SILVA et al., 1996). A ativação das CE e aumento no perfil de expressão de MMP-10 em doses sub tóxicas de jararagina foram observadas (LOPES et al., 2012b; SCHATNER et al., 2005).

Células endoteliais em cultura em matrigel formam estruturas tipo tubulares com compartimentos luminais rudimentares, em presença de fatores angiogênicos (FOLKMAN, HAUDENSCHILD; 1980). Embora tiver observado formações tipo capilares em cultura de células HUVEC-CS e SVMC tratadas com botropasina, nossos resultados de cultura em matrigel mostram que as proteínas Bt nas concentrações de 25-50 nM, a proteína DC 100 nM, e o peptídeo HCR 50 nM são tubulogênicos, confirmando o potencial angiogênico dos tratamentos, e que a presença do domínio catalítico não impede a formação de tubulogênese.

Os experimentos dos eventos da angiogênese *in vitro* mostraram dos peptídeos Ca II, Ca III e HCR mostraram correlação com a predição de peptídeos antiangiogênicos AntiAngioPred, onde o peptídeo HCR é angiogênico (escore negativo), enquanto que os peptídeos Ca II e Ca III são antiangiogênicos (escore positivo). Apesar dos peptídeos Ca II e Ca III apresentarem em um dos extremos a sequência ECD, que é um ligando de união às integrinas (MC LANE 1998), em condições experimentais, nas quais não há a adição de agentes redutores que evitem a oxidação das pontes, pode haver alguma formação de pontes, como as observadas no motivo ECD da proteína nativa. O peptídeo HCR apresentou potencial angiogênico em todos os experimentos descritos e sem toxicidade celular em ampla faixa de

concentrações, sendo direcionada ao interior da célula e no núcleo como mostrado na imunofluorescência com o peptídeo HCR-FITC. Embora não foi possível concluir o mecanismo molecular pelo qual o peptídeo induz os eventos angiogênicos *in vitro*, as análises *in silico* mostram que ele pode apresentar função de proteína sinalizadora tendo como ligandos GTP, FAD, e outros peptídeos contendo Zn, Mg e Ca.

Segundo os resultados de sinalização celular, o tratamento com Bt ativou significativamente a sinalização celular por FAK, regulador essencial na adesão e motilidade em células. Estas alterações são observadas como *cluster* de integrinas nas imunofluorescências em resposta aos tratamentos. A ativação significativa da FAK após tratamento com Bt, e em níveis mínimos no tratamento com DC, confirma que a ativação do FAK está relacionada com a atividade proteolítica do domínio catalítico, que na dose de 200 nM não induz perda da aderência, mas consegue ativar as quinases de adesão focal. Isto nos diz que o tratamento com Bt, via sinalização por integrinas, vai ter um efeito na sinalização com efeitos no rearranjo do citoesqueleto de actina, como observado na morfologia das células em concentrações de 500 e 1000 nM. Estes efeitos também foram observados em células epiteliais tratadas com jararagina (COSTA; SANTOS, 2004) que induziu a polimerização de actina e formação de processos celulares associados à motilidade. Em células de neuroblastoma, jararagina também estimula a propagação, a dinâmica de actina, crescimento de neuritos, e a ativação de GTPase Rac1 (COSTA et al., 2008).

A maioria de compostos terapêuticos tem como alvo as vias de sinalização. A compreensão dos mecanismos moleculares reguladores é fundamental para o desenvolvimento de terapias alvo pró - e anti-angiogênicas, as quais podem proporcionar benefícios no tratamento isquêmico. Entre os vários fatores estimulantes de angiogênese, VEGF é um dos mais efetivos e predominantes, sendo reportada a ativação de várias vias de sinalização como MAPK, PI3K e PKC pelo VEGF (CLAESSON-WELSH, 2003). Neste trabalho foram avaliados a expressão de proteínas (e sua correspondente fosforilação) envolvidas nas vias de sinalização de ERK, PI3/AKT, p38 e DLL4 nas concentrações de 25 nM para todos os tratamentos. A concentração de botropasina 25 nM, considerada sem efeitos tóxicos mas com propriedades proliferativas e migratórias segundo nossos experimentos, foi utilizada na avaliação das vias de sinalização.

A via de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos MAPK (*Mitogenic Activated Protein Kinase*) originalmente conhecida como a via de ERK (*Extracellular signal-related kinase* ERK) (extracelular signal-regulated kinases) é sinalizada em resposta a estímulos extracelulares como mitógenos, fatores de crescimento e citocinas (ROUX AND BLENNIS,

2004), envolve a comunicação pela adição de grupos fosfatos que ativam as proteínas da via (Ras-Rak-MEK-ERK). Esta via é essencial na proliferação e migração das células endoteliais mediadas por VEGF, conseqüentemente mutações nas proteínas da via estão envolvidas no desenvolvimento de câncer. Nossos resultados mostram a Bt e DC comportam-se como mitógenos, sendo o DC mais intenso na resposta mitógena.

A ativação do Akt fosforila uma série de substratos que podem regular processos celulares como sobrevivência, metabolismo de glicose, (WHYMANN, et al. 2003). A Bt ativa a via de sobrevivência crescimento e proliferação celular das CE, esta via não é sinalizada com os tratamentos BT-I e DC. A Fak participa na dinâmica de adesão celular e processo de espraiamento, cumprindo uma função na mobilidade e sobrevivência da célula. A fosforilação de FAK pela Bt está associado com a perda do espraiamento e rearranjo do citoesqueleto e preparando-se para a migração. A ativação de AKt pela Bt ativa a via de sobrevivência celular por AKT. A Bt inativa não apresentou alterações significativas na fosforilação destas vias de sinalização, enquanto que O DC, além de ativar ERK, ativa a via de estresse celular.

Outro marcador importante das células endoteliais durante a angiogênese é Delta-like 4 (DLL4). O DLL4 é um receptor transmembrana, ligante de Notch, expresso seletivamente nas células endoteliais arteriais e células angiogênicas *tip cells* durante o desenvolvimento (HELLSTRÖM; PHNG; GERHARDT, 2007; SUCHTING et al., 2007), promovendo a ramificação das células endoteliais (PEDROSA et al., 2015), sendo normalmente induzido por VEGF (THURSTON-GAVIN, NOGUERA-TROISE, YANCOPOULOS; 2007) no desenvolvimento vascular e angiogênese (CARMELIET et al., 1996), observado nos vasos e artérias maiores em maturação embrionária, e posteriormente é expresso só nos pequenos vasos e capilares. A quantificação do DLL4/actina mostrou que o tratamento com Bt aumento significativamente a expressão de DLL4, e pode estar relacionado com a formação de estruturas tubulares, via a ativação da sinalização de Notch. Nos géis do western blotting, os tratamentos Bt e HCR mostram padrões semelhantes de expressão, o DLL4 de 64 kDa, e a formação de prováveis dímeros complexos de tamanho aproximado de 130 kDa. Isto nos leva a sugerir que talvez regiões pertencentes ao domínio M, como o açúcar, íon Ca, ou outras moléculas diferentes ao domínio catalítico possam estar envolvidas na ativação da via de sinalização de Notch, no entanto estudos de dos ligantes associados precisam ser realizados, já que podem ser receptores citoplasmáticos ou proteínas de membrana. Por outro lado, a semelhança estrutural com as cadeias A e C do complexo de transcrição de Notch do estudo in silico, indica que ele pode agir diretamente no núcleo, explicando a presença do peptídeo no núcleo como observado na imunofluorescência.

O secretoma é o conjunto de fatores sintetizados e secretados ao espaço extracelular, e inclui também as proteínas transmembrana. Estes fatores incluem proteínas, moléculas de sinalização intercelular, peptídeos, lipídios, DNAs livres, microRNAs e vesículas extracelulares (exossomos e micropartículas). O estudo do secretoma é significativo já que 20% do proteoma humano são proteínas secretadas (MUKHERJEE; MANI, 2013). As metodologias disponíveis para o estudo do secretoma são diversas, entre estas o método baseado na separação em gel seguido da identificação por espectrometria de massa foi utilizado neste trabalho (MUKHERJEE; MANI, 2013). O estudo do secretoma da célula endotelial é importante pelo uso como biomarcadores clinicamente validados para identificar lesão e disfunção endotelial. Existe a hipótese que capacidade biológica da célula endotelial progenitora restaurar a integridade do endotélio após uma lesão vascular, está sob rígido controle de mecanismos autócrino e parácrinos que afetam as células endoteliais progenitoras através da modificação dos componentes do secretoma, que envolve recrutamento, migração, diferenciação e liberação de fatores pro-angiogênicos, mas não estão totalmente elucidados. (BEREZIN, 2017).

A análise por espectrometria de massa das proteínas mais expressas no sobrenadante sugere a secreção de vimentina em resposta ao tratamento com Bt, e secreção de calistatina em resposta ao tratamento com DC. A proteína vimentina possui a forma tanto intracelular como forma secretada, sendo expresso como filamento intermediário no citoplasma de CE, linfócitos, neutrófilos e fibroblastos. A expressão de vimentina citoplasmática está correlacionada com a motilidade e adesão das células e é utilizada como um marcador da transição epitélio mesênquimal (TEM)(MENDEZ; KOJIMA; GOLDMAN, 2010). Assim, células epiteliais que começam a expressar vimentina, diminuem a expressão de proteínas de junção na superfície celular como E-caderina (ACLOQUE et al., 2009), sendo a expressão de vimentina uma característica dos câmbios no citoesqueleto (MENDEZ; KOJIMA; GOLDMAN, 2010). Diversos estudos sugerem que a secreção de vimentina pode estar envolvida com as vias de sinalização de inflamação, sendo os níveis de vimentina correlacionados com a extensão da inflamação. Interessantemente, o câncer epitelial expressa vimentina durante a TEM sendo utilizado como alvo no diagnóstico (LEE, SJ. Et al;2014). Por outro lado, o secretoma pró-inflamatório das células endoteliais é descrito por ter efeitos deletérios na vasculatura em modelos animais. Sabe-se que o amplo espectro de citocinas pró-inflamatórias predominantemente IL-6 e TNF- α via ativação de NF- κ B pode ser estimulada a secreção sustentada de micropartículas que mobilizam e diferenciam células progenitoras endoteliais, células imunes, bem como a deposição exagerada de colágeno extravascular, levando a uma

remodelação adversa da vasculatura ou angiogênese patológica (Berezini 2017). Em relação a calistatina secretada pelo tratamento com DC, se sabe que a calistatina é um potente inibidor da angiogênese e progressão tumoral (MIAO, R., et al., 2002), sendo o secretoma do tratamento com DC com efeito antagônico ao secretoma do tratamento com Bt (angiogênese patológica).

Embora, peptídeos lineares sintetizados têm limitado potencial como drogas candidatas na angiogênese terapêutica pela pouca estabilidade, nossos resultados *in vitro* mostram que o peptídeo linear HCR apresenta capacidade em induzir todos os eventos de angiogênese, sem toxicidade em ampla faixa, e foi mostrado que ingressa no citoplasma e núcleo da célula, sinalizando de dentro para fora. No entanto o mecanismo exato de sinalização não foi esclarecido, pelo que outros estudos deveriam ser realizados. Ao longo do tempo dos experimentos, o peptídeo HCR-FITC tem se mostrado estável na sua ação, mas no ensaio de microscopia com focal em ensaios de Co localização com integrinas, a fluorescência do peptídeo HCR-FITC se apaga rapidamente na exposição ao laser. Uma forma de melhorar a estabilidade de peptídeos lineares é a síntese em estruturas cíclicas, aumentando a estabilidade do peptídeo e seu potencial na terapia angiogênica (CHAN et al., 2011), dado que também pode ser considerado para possíveis estudos com este peptídeo. O peptídeo cíclico ALT-C PEPT (CRASMSECDPAEH-NH₂) originado da sequência da alternagina-C (*Bothrops alternatus*) e contendo a sequência ECD, induz a formação de novos vasos sanguíneos *in vivo* e modula a expressão de fatores de crescimento (SANT'ANA et al., 2008). Nossos peptídeos CAII e CAIII que apresentaram sequências ECD, na soma dos ensaios angiogênicos não mostraram potencial angiogênico, pelo contrário, se sugere o estudo deles como peptídeos inibidores da angiogênese. As vantagens dos peptídeos são comparadas aos anticorpos: curto tempo de vida média, inibição reversível e principalmente baixa imunidade, assim como sua síntese em ampla escala, sendo o peptídeo HCR candidato potencial para estudo em modelos de isquemia *in vivo*.

6 CONCLUSÃO

- A proteína botropasina induz os eventos de angiogênese *in vitro*: proliferação, migração, adesão, secreção e tubulogênese na célula HUVEC-CS. A botropasina modula estes eventos via sinalização por integrinas e sinalização de Notch, induzindo células com fenótipo *tip cells*. A sinalização via integrinas ativam a via de FAK levando a ativação de receptores Mapkinases Erk e Akt. Os resultados do tratamento com Botropasina sugere uma angiogênese patológica devido a componentes inflamatórios secretados pelas células.
- A proteína DC também induz os eventos de angiogênese *in vitro* via sinalização com integrinas e ativação de receptores Mapkinases Erk. Os resultados sugerem uma angiogênese não patológica.
- O peptídeo HCR modula os eventos da angiogênese proliferação, migração e tubulogênese, ingressando ao interior da célula tanto no citoplasma como no núcleo, agindo como um peptídeo sinal, no entanto os mecanismos moleculares faltam ser elucidados.
- Os peptídeos Ca II e Ca III que apresentaram o motivo ECD na sua estrutura, não apresentam todos os eventos da angiogênese *in vitro*. Modificações na interação dos resíduos que o compõem podem ter modificado as propriedades dos resíduos na proteína nativa.

REFERÊNCIAS*

- ACLOQUE, H.; ADAMS, M. S.; FISHWICK, K.; BRONNER-FRASER, M.; NIETO, M. A. **Epithelial-mesenchymal transitions: The importance of changing cell state in development and disease***Journal of Clinical Investigation*American Society for Clinical Investigation, , jun. 2009.
- AHN, OG, BROWN, MJ. **Role of Endothelial progenitors and other bone marrow-derived cells in the development of tumor vasculature**. *Angiogenesis*, v.12, p. 159-164.
- BEREZIN, A. E. *Insights in Biology and Medicine Endothelial Repair and Endothelial Cell-Derived Secretome*. 2017.
- BISHT, M.; DHASMANA, D.; BIST, S. Angiogenesis: Future of pharmacological modulation. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 42, n. 1, p. 2, fev. 2010.
- BOLDRINI-FRANÇA, J.; COLOGNA, C. T.; PUCCA, M. B.; BORDON, K. DE C. F.; AMORIM, F. G.; ANJOLETTE, F. A. P.; CORDEIRO, F. A.; WIEZEL, G. A.; CERNI, F. A.; PINHEIRO-JUNIOR, E. L.; SHIBAO, P. Y. T.; FERREIRA, I. G.; DE OLIVEIRA, I. S.; CARDOSO, I. A.; ARANTES, E. C. **Minor snake venom proteins: Structure, function and potential applications***Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 2017.
- BRANDÃO, D.; COSTA, C.; MANSILHA, A. Angiogênese e Arteriogênese na Doença Arterial Periférica. **Angiologia e Cirurgia Vascul**, v. 8, n. 2, p. 53–59, 2012.
- CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C.; MONLEÓN, D.; ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. **Snake venom disintegrins: Evolution of structure and function***Toxicon*, jun. 2005.
- CARMELIET, P. **Angiogenesis in health and disease***Nature Medicine*, 1 jun. 2003.
- CHAN, L. Y.; GUNASEKERA, S.; HENRIQUES, S. T.; WORTH, N. F.; LE, S. J.; CLARK, R. J.; CAMPBELL, J. H.; CRAIK, D. J.; DALY, N. L. Engineering pro-angiogenic peptides using stable, disulfide-rich cyclic scaffolds. **Blood**, v. 118, n. 25, p. 6709–6717, 2011.
- CORREA, J. 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, n. 6, 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 snake envenomation-induced local inflammation. **Inflammation**, v. 26, n. 1, p. 13–17, fev. 2002.
- COSTA, E. P.; DEL DEBBIO, C. B.; CINTRA, L. C.; DA FONTOURA COSTA, L.; 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, n. 2, p. 380–384, 1 ago. 2008.
- DESGROSELLIER, J. S.; CHERESH, D. A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. **Nature Reviews: Cancer**, v. 10, n. 1, p. 9–22, 2010.
- DEMIR, R.; YABA, A.; HUPPERTZ, B. Vasculogenesis and angiogenesis on the endometrium during menstrual cycle and implantation. **Acta Histochemica**, v. 112, p. 203-214.
- DRAKE, C. J. **Embryonic and adult vasculogenesis***Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, fev. 2003.
- FENG, J.; ZHANG, Y.; XING, D. Low-power laser irradiation (LPLI) promotes VEGF expression and vascular endothelial cell proliferation through the activation of ERK/Sp1 pathway. **Cellular Signalling**, v. 24, n. 6, p. 1116–1125, 1 jun. 2012.
- FERRARA, N.; KERBEL, R. S. **Angiogenesis as a therapeutic target***Nature*, 15 dez. 2005.
- FOLKMAN, J.; HAUDENSCHILD, C. C.; ZETTER, B. R. Long-term culture of capillary endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 10, p. 5217–5221, out. 1979.
- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. **Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 repolysin family of metalloproteinases***Toxicon*, 2005.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **The FEBS journal**, v. 275, n. 12, p. 3016–30, jun. 2008.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. **Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research** **Journal of Proteomics**, 2009.

GALLAGHER, P.; BAO, Y.; SERRANO, S. M. T.; LAING, G. D.; THEAKSTON, R. D. G.; GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; ZIGRINO, P.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; NISCHT, R.; MAUCH, C.; MOSKALUK, C.; FOX, J. W. Role of the snake venom toxin jararhagin in proinflammatory pathogenesis: In vitro and in vivo gene expression analysis of the effects of the toxin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 441, n. 1, p. 1–15, 2005.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein Analysis Tools on the ExPASy Server 571 571 Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. [s.d.].

GENERSCH, E.; HAYESS, K.; NEUENFELD, Y.; HALLER, H. Sustained ERK phosphorylation is necessary but not sufficient for MMP-9 regulation in endothelial cells: involvement of Ras-dependent and -independent pathways. **Journal of cell science**, v. 113 Pt 23, p. 4319–4330, 2000.

GIFFORD, S. M.; GRUMMER, M. A.; PIERRE, S. A.; AUSTIN, J. L.; ZHENG, J.; BIRD, I. M. Functional characterization of HUVEC-CS: Ca²⁺ signaling, ERK 1/2 activation, mitogenesis and vasodilator production. **The Journal of endocrinology**, v. 182, n. 3, p. 485–99, set. 2004.

GUTIERREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, n. 9–10, p. 841–850, 2000.

HELLSTRÖM, M.; PHNG, L.-K.; GERHARDT, H. VEGF and Notch signaling: the yin and yang of angiogenic sprouting. **Cell adhesion & migration**, v. 1, n. 3, p. 133–6, 2007.

HUTTENLOCHER, A.; HORWITZ, A. R. Integrins in cell migration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 9, p. 1–16, 1 set. 2011.

IRVIN, M. W.; ZIJLSTRA, A.; WIKSWO, J. P.; POZZI, A. Techniques and assays for the study of angiogenesis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 239, n. 11, p. 1476–1488, nov. 2014.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of alpha 2 beta 1-integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochem J**, v. 320 (Pt 2, p. 635–641, 1996.

KAMIGUTI, A. S.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; LAING, G. D.; KNAPP, T.; ZUZEL, M.; CRAMPTON, J. M.; THEAKSTON, R. D. G. Collagen-induced secretion-dependent phase of platelet aggregation is inhibited by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1335, n. 1–2, p. 209–217, 17 abr. 1997.

KRÄLING, B. M.; WIEDERSCHAIN, D. G.; BOEHM, T.; REHN, M.; MULLIKEN, J. B.; MOSES, M. A. The role of matrix metalloproteinase activity in the maturation of human capillary endothelial cells in vitro. **Journal of cell science**, v. 112 (Pt 1, p. 1599–609, maio 1999.

LAING, G. D.; MOURA-DA-SILVA, A. M. **Jararhagin and its multiple effects on hemostasis** **Toxicon**, 15 jun. 2005.

LOPES, D. S.; FAQUIM-MAURO, E.; MAGALHÃES, G. S.; LIMA, I. C.; BALDO, C.; FOX, J. W.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; CLISSA, P. B. Toxicon Gene expression of inflammatory mediators induced by jararhagin on endothelial cells. **Toxicon**, v. 60, n. 6, p. 1072–1084, 2012a.

LOPES, D. S.; FAQUIM-MAURO, E.; MAGALHÃES, G. S.; LIMA, I. C.; BALDO, C.; FOX, J. W.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; CLISSA, P. B. Gene expression of inflammatory mediators induced by jararhagin on endothelial cells. **Toxicon**, v. 60, n. 6, p. 1072–1084, nov. 2012b.

MAILHOS, C.; LEWIS, J.; ISH-HOROWICZ, D.; MODLICH, U.; HARRIS, A.; BICKNELL, R. Delta4, an endothelial specific Notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis. **Differentiation**, v. 69, n. 2–3, p. 135–144, 31 dez. 2001.

MALININ, N. L.; PLUSKOTA, E.; BYZOVA, T. V. **Integrin signaling in vascular function** **Current Opinion**

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

in **Hematology** NIH Public Access, maio 2012.

MANDELBAUM, F. R.; REICHEL, A. P.; ASSAKURA, M. T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (Jararaca). **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, v. 20, n. 6, p. 955–72, 1982.

MARIA, D. A.; DA SILVA, M. G. L.; CORREIA JUNIOR, M. C.; RUIZ, I. R. G. Antiproliferative effect of the jararhagin toxin on B16F10 murine melanoma. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, p. 446, 2014.

MARKLAND, F. S.; SWENSON, S.; JR, F. S. M. Toxicon Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 3–18, 2013.

MENDEZ, M. G.; KOJIMA, S. I.; GOLDMAN, R. D. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 6, p. 1838–1851, jun. 2010.

MIAO, R.; AGATHA, J.; CHANG, L.; CHAO, J. Kallistatin is a new inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Blood**, v. 100, n. 9, p. 3245–3252, 2002.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; BALDO, C. Jararhagin, a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from *Bothrops jararaca*. **Toxicon**, v. 60, n. 3, p. 280–289, 2012.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; LAING, G. D.; PAINE, M. J. I.; DENNISON, J. M. T. J.; POLITI, V.; CRAMPTON, J. M.; THEAKSTON, R. D. G. Processing of pro-tumor necrosis factor- α by venom metalloproteinases: A hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **European Journal of Immunology**, v. 26, n. 9, p. 2000–2005, set. 1996.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; LÍNICA, A.; DELLA-CASA, M. S.; KAMIGUTI, A. S.; HO, P. L.; CRAMPTON, J. M.; THEAKSTON, R. D. Jararhagin ECD-containing disintegrin domain: expression in *Escherichia coli* and inhibition of the platelet-collagen interaction. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 369, n. 2, p. 295–301, 1999.

MUKHERJEE, P.; MANI, S. Methodologies to decipher the cell secretome. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 11, p. 2226–2232, nov. 2013.

MUNIZ, J. R. C.; AMBROSIO, A. L. B.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; COMINETTI, M. R.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; OLIVA, G.; GARRATT, R. C.; SOUZA, D. H. F. The three-dimensional structure of bothropasin, the main hemorrhagic factor from *Bothrops jararaca* venom: Insights for a new classification of snake venom metalloprotease subgroups. **Toxicon**, v. 52, n. 7, p. 807–816, dez. 2008.

OLIVEIRA, A. K.; PAES LEME, A. F.; ASSAKURA, M. T.; MENEZES, M. C.; ZELANIS, A.; TASHIMA, A. K.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C.; CAMARGO, A. C. M.; FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Simplified procedures for the isolation of HF3, bothropasin, disintegrin-like/cysteine-rich protein and a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 53, n. 7–8, p. 797–801, jun. 2009.

PAES LEME, A. F.; ESCALANTE, T.; PEREIRA, J. G. C.; OLIVEIRA, A. K.; SANCHEZ, E. F.; GUTIÉRREZ, J. M.; SERRANO, S. M. T.; FOX, J. W. High resolution analysis of snake venom metalloproteinase (SVMP) peptide bond cleavage specificity using proteome based peptide libraries and mass spectrometry. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 4, p. 401–410, 1 abr. 2011.

PAINE, M. J. I.; DESMOND, H. P.; DAVID, R.; THEAKSTONS, G.; CRAMPTON, J. M. Purification, Cloning, and Molecular Characterization of a High Molecular Weight Hemorrhagic Metalloprotease, Jararhagin, from *Bothrops jararaca* Venom. **J Biol Chem**, v. 267, n. 32, p. 22869–22876, 1992.

PANKOV, R.; YAMADA, K.M. Fibronectin at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 3861–3863, 2002.

PAL, S. K.; GOMES, A.; DASGUPTA, S. C.; GOMES, A. Snake venom as therapeutic agents: from toxin to drug development. **Indian journal of experimental biology**, v. 40, n. 12, p. 1353–8, dez. 2002.

PEIRCE, S. M.; GABHANN, F. MAC; BAUTCH, V. L. **Integration of experimental and computational approaches to sprouting angiogenesis** *Current Opinion in Hematology*.

RAMAPRASAD, A. S. E.; SINGH, S.; GAJENDRA, R. P. S.; VENKATESAN, S. AntiAngioPred: A server for prediction of anti-angiogenic peptides. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0136990, 3 set. 2015.

RAMOS, O. H. P.; TERRUGGI, C. H. B.; RIBEIRO, J. U.; COMINETTI, M. R.; FIGUEIREDO, C. C.;

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

- BÉRARD, M.; CREPIN, M.; MORANDI, V.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Modulation of in vitro and in vivo angiogenesis by alternagin-C, a disintegrin-like protein from Bothrops alternatus snake venom and by a peptide derived from its sequence. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 461, n. 1, p. 1–6, 1 maio 2007.
- RIBATTI, D.; CRIVELLATO, E. “**Sprouting angiogenesis**”, a reappraisal **Developmental Biology**, 15 dez. 2012.
- SANT’ANA, E. M. C.; GOUVÊA, C. M. C. P.; NAKAIE, C. R.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Angiogenesis and growth factor modulation induced by alternagin C, a snake venom disintegrin-like, cysteine-rich protein on a rat skin wound model. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 479, n. 1, p. 20–7, 1 nov. 2008.
- SARIC, T.; GRAEF, C. I.; GOLDBERG, A. L. Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 45, p. 46723–32, 5 nov. 2004.
- SARRAY, S.; LUIS, J.; EL, M.; MARRAKCHI, N. Snake Venom Peptides: Promising Molecules with Anti-Tumor Effects. In: **Bioactive Food Peptides in Health and Disease**. InTech, 2013. p. 219–238.
- SCHATTNER, M.; FRITZEN, M.; DE SOUZA VENTURA, J.; DE ALBUQUERQUE MODESTO, J. C.; POZNER, R. G.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. The snake venom metalloproteases berythracivase and jararhagin activate endothelial cells. **Biological Chemistry**, v. 386, n. 4, p. 369–374, 2005.
- SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; COMINETTI, M. R.; TERRUGGI, C. H. B.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; DE FREITAS, M. S.; CREPIN, M.; FIGUEIREDO, C. C.; MORANDI, V. Alternagin-C, a disintegrin-like protein from the venom of Bothrops alternatus, modulates alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 38, n. 10, p. 1505–11, out. 2005.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 1, p. 5–29, jan. 2015.
- SONG, J. K.; JO, M. R.; PARK, M. H.; SONG, H. S.; AN, B. J.; SONG, M. J.; HAN, S. B.; HONG, J. T. Cell growth inhibition and induction of apoptosis by snake venom toxin in ovarian cancer cell via inactivation of nuclear factor κ b and signal transducer and activator of transcription 3. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 5, p. 867–876, 29 maio 2012.
- SUCHTING, S.; FREITAS, C.; LE NOBLE, F.; BENEDITO, R.; BREANT, C.; DUARTE, A.; EICHMANN, A. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 9, p. 3225–3230, 27 fev. 2007.
- TAKAHASHI, K.; SAWASAKI, Y.; HATA, J.-I.; MUKAI, K.; GOTO, T. Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 26, n. 3, p. 265–274, mar. 1990.
- TANJONI, I.; WEINLICH, R.; DELLA-CASA, M. S.; CLISSA, P. B.; SALDANHA-GAMA, R. F.; DE FREITAS, M. S.; BARJA-FIDALGO, C.; AMARANTE-MENDES, G. P.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. **Apoptosis**, v. 10, n. 4, p. 851–861, 2005.
- VYAS, V. K.; BRAHMBHATT, K.; BHATT, H.; PARMAR, U. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, n. 2, p. 156–62, fev. 2013.
- WALSH, E. M.; MARCINKIEWICZ, C. **Non-RGD-containing snake venom disintegrins, functional and structural relations** **Toxicon**, 15 set. 2011.
- WEIS, S. M.; CHERESH, D. A. **Tumor angiogenesis: Molecular pathways and therapeutic targets** **Nature Medicine**, 1 nov. 2011.
- ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 40, 23 jan. 2008.