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**

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.

Botrophasin (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 botrophasin, could directly modulate the phenotypic transitions of the angiogenic process. The objective of this work was to characterize the effects of Botrophasin, 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, MPP 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 bothropasin 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.

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 consequentemente sintetizamos peptídeos contendo sequências conservadas correspondentes aos domínios DC da botropasina, com a finalidade de determinar se estas sequências 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 reprotisina 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 (PAINE et al., 1992b) (PAINE 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 Conserved 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.

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 Mapquinas 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 Mapquinas 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. Angiogénese e Arteriogénese na Doença Arterial Periférica. **Angiologia e Cirurgia Vascular**, 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.; BAIRROCH, 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 berythrin 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 $\alpha 2\beta 1$ 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.