UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
e Análises Toxicológicas.

**Caracterização dos efeitos do Amblyomin-X sobre a
angiogênese e a célula endotelial**

Rodrigo Yukio Shiroma Dias

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE.

Orientador:
Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo, Novembro de 2010

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

D541c	Dias, Rodrigo Yukio Shiroma Caracterização dos efeitos do amblyomin-X sobre a angiogênese e a célula endotelial / Rodrigo Yukio Shiroma Dias. -- São Paulo, 2010. 86p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Orientador: Farsky, Sandra Helena Poliselli 1. Toxicologia experimental I. T. II. Farsky, Sandra Helena Poliselli, orientador.
615.90028 CDD	

Rodrigo Yukio Shiroma Dias

Caracterização dos efeitos do Amblyomin-X sobre
a angiogênese e a célula endotelial

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Sandra Farsky
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de ____.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Assistência Técnica Acadêmica

Ofício CEEA/FCF/ 09/2009

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Caracterização dos efeitos do Amblyomin-X sobre a Angiogênese e sobre a Função de Macrófagos” (Protocolo nº 212), de responsabilidade da pesquisadora Profa. Sandra Helena P. Farsky, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal – CEEA, desta Faculdade, em 19 de fevereiro de 2009.

São Paulo, 19 de fevereiro de 2009.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEEA/FCF/USP

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, GENTIL DIAS e MARIA SHIROMA DIAS, e à minha irmã, ANDREA SHIROMA DIAS pelo exemplo de vida, pelo amor, carinho e incentivo.

À Professora SANDRA FARSKY, orientadora deste trabalho, pelos valiosos e fundamentais conselhos, pela sua sabedoria e compreensão.

Aos amigos, ANDRÉ LUIZ TEROSO RIBEIRO (Cândo), TIAGO FRANCO OLIVEIRA, ANA LÚCIA BORGES SHIMADA (Anóca), LARA LOMBARDI E FABRÍCIO BAU DALMAS, pela compreensão, carinho e amizade eterna.

Às amigas CRISTINA BITCHELS HEBEDA DUARTE (Crisóca) e SIMONE BOLONHEIS (Simoninha), por estarem sempre dispostas a ajudar e serem amigas pra todas as horas.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia Experimental, Izabel, Zéca, Andrézinho, Camilinha, Camilona, Gabi, Marcela e Carine.

À Universidade de São Paulo, por acolher-me como aluno da pós-graduação e a CAPES e FAPESP por oferecerem estímulo científico e financeiro para a realização do trabalho.

Ao pessoal da limpeza (Dalva, Luzia e Helena), da administração (Ângelo e Nancy) e a todos os Professores do Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas (Maurício, Elizabeth, Tânia, Ernani, Ana Paula e Regina Lúcia), por propiciarem um ambiente agradável de trabalho.

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, participaram deste trabalho e que me auxiliaram com seus conhecimentos e experiências de vida.

Sumário

RESUMO	6
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Serinoproteases	10
1.2 Inibidores de serinoproteases.....	12
1.2.1 Inibidores de serinoproteases do tipo Kunitz	13
1.3 Amblyomin-X	14
2. Angiogênese no desenvolvimento tumoral	16
2.1 Permeabilidade Vascular e Angiogênese.....	21
2.2 Aderência e Migração das células endoteliais	22
2.3 Mediadores químicos da angiogênese	24
2.3.1 Papel do VEGF	24
2.3.2 Papel da PGE2	25
2.3.3 Papel do NO	26
3. OBJETIVOS	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Animais	29
4.2 Obtenção do Amblyomin-X.....	29
4.3 Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF)	29
4.4 Culturas celulares	30
4.5 Ensaio de angiogênese in vivo: modelo da câmara dorsal	31
4.6 Avaliação da permeabilidade vascular	34
4.7 Avaliação de migração da célula endotelial	35
4.8 Avaliação de aderência da célula endotelial	36
4.9 Determinação de mediadores químicos	36
4.10 Determinação da viabilidade de células de melanoma da linhagem B16-F10	37
4.11 Análise estatística	38
5. RESULTADOS	39
5.1 Efeitos da aplicação tópica do Amblyomin-X sobre a rede microcirculatória	39
5.2 Efeitos da aplicação tópica do Amblyomin-X sobre a rede microcirculatória na presença de células tumorais	44
5.2.1 Efeitos do tratamento simultâneo.....	44
5.3 Efeitos da aplicação tópica do Amblyomin-X sobre a instalação e desenvolvimento de tumor no tecido subcutâneo dorsal dos animais.....	49

5.3.1 Efeitos do tratamento simultâneo	49
5.3.2 Efeitos do tratamento posterior	54
5.4 Efeitos do Amblyomin-X sobre a permeabilidade vascular	57
5.5 Efeitos do Amblyomin-X sobre a migração de células endoteliais	58
5.5.1 Modelo bidimensional.....	58
5.6 Efeitos do Amblyomin-X sobre a migração das células endoteliais	60
em condições basais e na vigência de estímulo pelo VEGF	60
5.6.1 Modelo bidimensional.....	60
5.6.2 Modelo tridimensional.....	61
5.7 Efeitos do Amblyomin-X sobre a aderência da célula endotelial em Matrigel®	62
5.8 Efeitos do Amblyomin-X sobre a concentração de nitrito (NO ₂ ⁻) no sobrenadante de células endoteliais	63
5.9 Efeitos do Amblyomin-X sobre a secreção de prostaglandina E2 (PGE2) pelas células endoteliais	64
5.10 Efeitos do Amblyomin-X sobre a viabilidade de células de melanoma murino da linhagem B16-F10.....	65
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÃO	73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Etapas da angiogênese.....	18
Figura 2 Manipulação cirúrgica para implantação da câmara dorsal em camundongos	31
Figura 3 Variação do número de vasos do tecido subcutâneo dorsal de camundongos tratados topicamente com solução salina (10 μ L) ou com Amblyomin-X (10, 100 ou 1000ng/mL)	39
Figura 4. Efeito da aplicação tópica de solução salina sobre a rede microcirculatória dorsal de camundongos Swiss	40
Figura 5. Efeito da aplicação tópica de 10 ng/mL de Amblyomin-X sobre a rede microcirculatória dorsal de camundongos Swiss.....	41
Figura 6. Efeito da aplicação tópica de 100 ng/mL de Amblyomin-X sobre a rede microcirculatória dorsal de camundongos Swiss	42
Figura 7. Efeito da aplicação tópica de 1000 ng/mL de Amblyomin-X sobre a rede microcirculatória dorsal de camundongos Swiss	43
Figura 8. Variação do número de vasos do tecido subcutâneo dorsal de camundongos tratados topicamente com solução salina (10 μ L) ou com Amblyomin-X (10, 100 ou 1000ng/mL) na vigência do desenvolvimento de células cancerosas	44
Figura 9. Efeito da aplicação tópica de solução salina sobre a rede microcirculatória dorsal de camundongos Swiss na vigência de células cancerosas	45
Figura 10. Efeito da aplicação tópica de 10 ng/mL de Amblyomin-X sobre a rede microcirculatória dorsal de camundongos Swiss na vigência de células B16-F10 ...	45
Figura 11. Efeito da aplicação tópica de 100 ng/mL de Amblyomin-X sobre a rede microcirculatória dorsal de camundongos Swiss na vigência de células B16-F10....	46
Figura 12. Efeito da aplicação tópica de 1000 ng/mL de Amblyomin-X sobre a rede microcirculatória dorsal de camundongos Swiss na vigência de células B16-F10 ...	46

Figura 13. Variação do número de vasos do tecido subcutâneo dorsal de camundongos tratados topicamente com solução salina (10 μ L) ou com Amblyomin-X (10, 100 ou 1000ng/mL) na vigência do desenvolvimento de células cancerosas47

Figura 14. Efeito da aplicação tópica de solução salina sobre a rede microcirculatória dorsal de camundongos Swiss na vigência de células cancerosas47

Figura 15. Efeito da aplicação tópica de 1000 ng/mL de Amblyomin-X sobre a rede microcirculatória dorsal de camundongos Swiss na vigência de células B16-F10 ...48

Figura 16. Área do tumor induzido pela aplicação de células da linhagem de melanoma murino B16F10 no tecido subcutâneo dorsal de camundongos, tratados topicamente com solução salina (10 μ L) ou com Amblyomin-X (10, 100 ou 1000ng/mL)49

Figura 17. Evolução da massa tumoral induzida pela injeção subcutânea de células de melanoma murino da linhagem B16F10 no dorso de camundongos, tratados com solução salina.....50

Figura 18. Evolução da massa tumoral induzida pela injeção subcutânea de células de melanoma murino da linhagem B16F10 no dorso de camundongos, tratados com solução de Amblyomin-X na concentração de 10ng/mL51

Figura19. Evolução da massa tumoral induzida pela injeção subcutânea de células de melanoma murino da linhagem B16-F10 no dorso de camundongos, tratados com solução de Amblyomin-X na concentração de 100ng/mL.....52

Figura 20. Evolução da massa tumoral induzida pela injeção subcutânea de células de melanoma murino da linhagem B16-F10 no dorso de camundongos, tratados com solução de Amblyomin-X na concentração de 1000ng/mL.....53

Figura 21. Área do tumor induzido pela aplicação de células B16-F10 no tecido subcutâneo dorsal de camundongos, tratados, posteriormente à aplicação das células cancerosas e topicamente, com solução salina (10 μ L) ou com Amblyomin-X (10, 100 ou 1000ng/mL)54

Figura 22. Evolução da massa tumoral induzida pela injeção subcutânea de células de melanoma murino da linhagem B16-F10 no dorso de camundongos, tratados com solução salina, topicamente, a cada 24 horas, no terceiro dia após a injeção de células cancerosas até 24 horas antes do sacrifício55

Figura 23. Evolução da massa tumoral induzida pela injeção subcutânea de células de melanoma murino da linhagem B16-F10 no dorso de camundongos, tratados com Amblyomin-X (1000ng/mL), topicamente, a cada 24 horas, no terceiro dia após a injeção de células cancerosas até 24 horas antes do sacrifício	56
Figura 24. Efeitos do Amblyomin-X sobre a permeabilidade vascular	57
Figura 25. Efeitos do tratamento com Amblyomin-X sobre a migração de células t-End na monocamada unicelular	58
Figura 26. Imagem representativa do ensaio de migração celular no modelo da monocamada antes e 12 horas após os tratamentos	59
Figura 27. Efeitos do tratamento com Amblyomin-X sobre a migração de células t-End na monocamada unicelular em condições basais ou após estímulo pelo VEGF	60
Figura 28. Efeitos do tratamento com Amblyomin-X sobre a migração de células t-End no modelo de Matrigel® associado a filtro de policarbonato em condições basais ou após estímulo pelo VEGF	61
Figura 29. Efeitos do tratamento com Amblyomin-X sobre a aderência de células t-End em Matrigel®	62
Figura 30. Efeitos do tratamento com Amblyomin-X sobre a produção de óxido nítrico pelas células t-End	63
Figura 31. Efeitos do tratamento com Amblyomin-X sobre a secreção de prostaglandina E2 pelas células t-End	64
Figura 32. Efeitos do Amblyomin-X (10, 100 e 1000ng/mL) sobre a viabilidade de células de melanoma murino da linhagem B16-F10	65

RESUMO

A proteína recombinante inibidora de serinoprotease denominada de Amblyomin-X foi obtida a partir de uma biblioteca de cDNA das glândulas salivares do carrapato *Amblyomma cajannense*, construída e utilizada para identificar um gene que codifica um inibidor de serinoprotease do tipo Kunitz. O Amblyomin-X inibe a formação da massa tumoral *in vivo*, no entanto o mecanismo envolvido neste efeito não está totalmente esclarecido. Visto que um dos mecanismos anti-carcinogênicos dos inibidores de serinoproteases é a inibição do processo de angiogênese, este trabalho foi delineado para avaliar as ações do Amblyomin-X sobre a angiogênese *in vivo* e sobre funções da célula endotelial envolvidas neste processo.

A angiogênese *in vivo* foi estudada em modelo de câmara dorsal por microscopia intravital. Quarenta e oito horas após a implantação da câmara dorsal, os animais receberam tratamento tópico de salina ou de Amblyomin-X por 8 dias, com intervalos de 48 horas a cada dose (10, 100 ou 1000ng/mL). Os efeitos foram avaliados em condições basais e na vigência do crescimento tumoral (injeção de 1×10^5 células B16-F10 de melanoma murino no tecido subcutâneo). Adicionalmente, os efeitos do Amblyomin-X sobre a permeabilidade vascular foram avaliados pela mensuração espectrofotométrica da quantidade de corante extravasado no tecido dos animais após injeção intradérmica do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) ou do Amblyomin-X.

Uma série de estudos *in vitro* foram realizados em células endoteliais de linhagem de microcirculação (t-End) para avaliar os efeitos do Amblyomin-X (10, 100 e 1000ng/mL) sobre: 1) a migração destas células, usando modelos bidimensional (2D) de cicatrização *in vitro* e tridimensional (3D) em câmara de Boyden modificada, na ausência e frente ao fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF; 100 ng/mL); 2) sobre a aderência em Matrigel® e 3) sobre a secreção de prostaglandina E2 (PGE2) e a produção de óxido nítrico (NO) por ensaio imunoenzimático e reação de Griess, respectivamente. Ademais, foram avaliados os efeitos do Amblyomin-X sobre a viabilidade das células B16-F10 (1×10^5) por citometria de fluxo.

Os resultados obtidos mostram que a aplicação tópica de Amblyomin-X reduziu o número de vasos no tecido subcutâneo dorsal (10ng/mL = 21,7%; 100ng/mL = 35,7%; 1000ng/mL = 36,8% vs 1º dia de tratamento). O mesmo efeito foi

observado na presença de células B16-F10 (1000ng/mL= 44,3% vs 1º dia de tratamento), além de uma redução no desenvolvimento da massa tumoral (1000ng/mL= 88% vs controle). O tratamento com Amblyomin-X reduziu a migração basal das células t-End no modelo 2D (10ng/mL=16,4%; 100ng/mL=23,1%; 1000ng/mL=26,8% vs controle) e 3D (10ng/mL=39,2%; 100ng/mL=49,4%; 1000ng/mL=50,4% vs controle); inibiu a adesão destas células endoteliais em Matrigel® (100ng/mL=46,4%; 1000ng/mL=48,4% vs controle); não alterou a produção dos mediadores químicos NO e PGE2 pelas células endoteliais; não modificou a permeabilidade vascular e não alterou a viabilidade das células de melanoma murino B16-F10.

Em conjunto, os dados obtidos mostram que o Amblyomin-X inibe a formação de novos vasos em condições basais e na vigência de crescimento tumoral in vivo e que este efeito pode estar relacionado à redução do desenvolvimento tumoral, uma vez que a concentração de Amblyomin-X que inibe a angiogênese não causou citotoxicidade às células tumorais in vitro. Além disso, os mecanismos envolvidos no processo de angiogênese podem ser decorrentes, pelo menos em parte, de prejuízos na migração e adesão das células endoteliais.

ABSTRACT

The recombinant serine protease inhibitor protein called Amblyomin-X was obtained from a cDNA library of the *Amblyomma cajennense* salivary glands constructed and used to identify a gene encoding a kunitz type serine protease inhibitor. Amblyomin-X presents inhibitory effect on tumoral mass formation *in vivo*. Nevertheless, the mechanisms involved in the effects have not been clarified. Considering that interference on angiogenesis process is one of the mechanisms responsible for the antitumor activity displayed by serine protease inhibitors, this project was undertaken to study the Amblyomin-X actions on this process and on related endothelial cell functions.

In vivo angiogenesis was studied using dorsal chamber model associated to intravital microscopy. Forty eight hours after dorsal chamber implantation, the animals were topically treated with saline or Amblyomin-X during 8 days, with intervals at each 48hs (10, 100 ou 1000ng/mL). The effects were evaluated at basal conditions or during tumoral development (1×10^5 B16-F10 murine melanoma cells injected into subcutaneous tissue). In addition, the effects of Amblyomin-X on vascular permeability were evaluated by measuring the dye leakage into dorsal intradermic tissue after local injection of vascular endothelial growth factor (VEGF) or Amblyomin-X, or both.

In vitro assays were also performed using endothelial cells from microcirculation (t-End) and the effects of Amblyomin-X (10, 100 e 1000ng/mL) were studied on: 1) cell migration, using bidimensional (2D) and tridimensional (3D) models in modified Boyden chamber using chemotatic factor (VEGF100 ng/mL); 2) Matrigel® adherence and, 3) prostaglandin E2 (PGE2) and nitric oxide (NO) secretion by enzymatic assay and Griess reaction, respectively. In addition, the Amblyomin-X toxicity was evaluated on the B16-F10 cells (1×10^5), using flow citometry.

Results obtained show that topic application of Amblyomin-X reduced the number of vessels in the subcutaneous dorsal tissue (10ng/mL = 21,7%; 100ng/mL= 35,7%; 1000ng/mL= 36,8% vs 1st day of treatment). The same effect was observed in the presence of B16-F10 cells (1000ng/mL= 44,3% vs 1st day of treatment), simultanesouly to a significant reduction on tumoral mass development (1000ng/mL= 88% vs control). Amblyomin-X treatment impaired basal migration of t-End in the 2D (10ng/mL=16,4%; 100ng/mL=23,1%; 1000ng/mL=26,8% vs control)

and 3D model (10ng/mL=39,2%; 100ng/mL=49,4%; 1000ng/mL=50,4% vs controle); inhibited the adhesion of t-End in Matrigel® (100ng/mL=46,4%; 1000ng/mL=48,4% vs control); did not alter the production of chemical mediators (PGE2 and NO); did not modify the vascular permeability and did not affect the B16-F10 cells viability.

Taken together, data here obtained show that Amblyomin-X inhibited the new vessels formation under basal conditions, and during tumoral development. The effect could be related to the reduction of tumoral progress also detected in vivo, as the schedule of treatment employed did not induce cancer cell toxicity. The mechanisms involved in the reduced angiogenesis may be related, at least in part, to the impaired endothelial cell migration and adhesion.

1. INTRODUÇÃO

Os venenos animais são fontes de moléculas bioativas, tais como peptídeos, proteínas e enzimas com importantes atividades farmacológicas. Desta forma, a compreensão dos mecanismos de ação dos venenos e suas toxinas, bem como a utilização destes como ferramentas científicas, têm contribuído amplamente para o esclarecimento das bases fisiopatológicas dos envenenamentos e de diferentes doenças (Fry *et al.*, 2009; Yamazaki & Morita, 2007). Além disso, a caracterização proteômica e funcional das toxinas isoladas destes venenos têm permitido o emprego destas como modelos para o desenvolvimento de novas moléculas com finalidade terapêutica (Millers *et al.*, 2009; Lanzer *et al.*, 2007; Koh *et al.*, 2006; Brook *et al.*, 2005; Perales *et al.*, 2005). Inibidores e ativadores de proteases têm sido isolados de diferentes venenos animais, dentre estes os carrapatos, e também amplamente estudados como interferentes da cascata da coagulação, fibrinólise, inflamação e da formação de metástases (Fry *et al.*, 2009; Yamazaki & Morita, 2007; Millers *et al.*, 2009; Perales *et al.*, 2005; Rucavado *et al.*, 2004).

1.1 Serinoproteases

Proteases, também conhecidas como peptidases ou enzimas proteolíticas, são enzimas que exercem funções indispensáveis em todas as células eucarióticas. Em células de mamíferos, desempenham papel relevante sobre: ativação de proteínas; resposta imune; sobrevivência e diferenciação celular; angiogênese; remodelagem da matriz extracelular; entre outros. Estas enzimas são abundantes e de ampla distribuição, sendo codificadas por aproximadamente 1200 genes, o que representa cerca de 4,5% do genoma humano (Shpacovitch *et al.*, 2008; Bertini *et al.*, 2009).

De acordo com seus mecanismos catalíticos, função, especificidade, sítios ativos, estrutura tridimensional, além das relações evolutivas das mesmas, seis classes de proteases têm sido reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (UIBBM) e classificadas nas seguintes famílias: as aspartilproteases, cisteinilproteases, metaloproteases, serinoproteases, treonilproteases e glutamatilproteases (Merops the Peptidase Database) <http://merops.sanger.ac.uk/>.

Dentre estas famílias, as serinoproteases compreendem cerca de 1/3 de todas as proteases conhecidas e identificadas até o presente momento. A tripsina é considerada o protótipo da família, já que as demais serinoproteases possuem em média 50% de similaridade com a mesma. Estas enzimas proteolíticas são proteínas globulares, produzidas na forma de precursores inativos (zimogênios). A conversão subsequente do zimogênio em forma enzimática biologicamente ativa é mediada por processo denominado “proteólise limitada” ou ativação de zimogênio. Serinoproteases são caracterizadas por apresentar um sítio de ativação do zimogênio, uma região que reconhece o substrato e um sítio catalítico, formado pela tríade de aminoácidos: serina, histidina e ácido aspártico (Janciauskiene *et al.*, 2000).

Estas enzimas desempenham funções essenciais na coagulação sanguínea, inflamação, pressão arterial, digestão protéica, sinalização celular, entre outros processos. Além disso, são relevantes para evolução tumoral, disseminação e consolidação das metástases, pois atuam intimamente na angiogênese, remodelação tecidual, migração celular e invasão do tumor (Woodward *et al.*, 2007).

Recentemente, tem sido demonstrado que proteases não atuam, primariamente, apenas como enzimas de degradação no espaço extracelular. Sabe-se que estas enzimas além da atividade proteolítica, também podem exercer efeitos importantes sobre a sinalização intracelular. Estes efeitos podem ser atribuídos à ativação de uma subfamília de receptores acoplados a proteína G, denominados receptores ativados por protease (PARs). Estes receptores são ativados por um mecanismo proteolítico irreversível e incomum, em que a protease se liga e cliva a região N- terminal do domínio extracelular do receptor. Esta clivagem gera uma nova região N-terminal no receptor, expondo um ligante endógeno que altera suas características conformacionais, iniciando desse modo, os mecanismos de sinalização intracelular. Após ativação, estes receptores induzem a transdução do sinal por diferentes vias: *Phospholipase-C* (PLC); *Mitogen - activated protein kinase* (MAPK); *Extracellular signal – regulated kinase* (ERK1/2), resultando na transcrição de genes envolvidos na migração, proliferação e sobrevivência celular (Steinhoff *et al.*, 2005). Por outro lado, algumas proteases podem atuar clivando regiões mais internas do sítio de ativação, inibindo a expressão deste sítio e impedindo a ativação proteolítica dos PARs (Traynelis & Trejo, 2007).

As serinoproteases regulam diversos processos fisiológicos essenciais para a vida, porém se não forem mantidas sob estrito controle, também podem participar da gênese de múltiplas doenças, incluindo doenças auto-imunes, doença de Alzheimer, inflamação, hipertensão e câncer (Ekici *et al.*, 2008).

Como já salientado, as serinoproteases atuam sobre a formação do câncer, modificando a relação estroma-tumor e acarretando à degradação da matriz extracelular, o que facilita a migração, aderência celular e invasão tecidual, contribuindo dessa maneira para a formação de metástases. Além dessa ação proteolítica, a interação entre as serinoproteases e os PARs pode resultar na ativação de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e outros mediadores que favorecem o processo de angiogênese, imprescindível para que ocorra a progressão do tumor (Skrzydowska *et al.*, 2005).

1.2 Inibidores de serinoproteases

O controle da ação das serinoproteases pelos seus inibidores endógenos limita a ação deletéria destas enzimas sobre o organismo, sendo fundamental para a manutenção da homeostasia e a prevenção de patologias, como o câncer. Desta forma, a descoberta de novos inibidores para o uso terapêutico é uma estratégia interessante para a área farmacêutica e da biotecnologia (Levine *et al.*, 2009; Greene & McElvaney, 2009)

Os inibidores de serinoproteases são agrupados em aproximadamente 20 famílias que diferem, estruturalmente, entre si e não compartilham do mesmo mecanismo inibitório. De acordo com o mecanismo de ação estes inibidores podem ser classificados em: inibidores canônicos, inibidores não canônicos e serpinas, do inglês *Serpin*, (*Serin protease inhibitor*). Os inibidores canônicos apresentam um mecanismo clássico, atuando como falsos substratos, conforme descrito na literatura (Laskowski & Kato, 1980). Interagem fracamente, de forma não covalente, com a enzima, e bloqueiam o sítio ativo, sem alterações conformacionais. Os inibidores não canônicos inibem as serinoproteases se ligando forte e especificamente ao sítio ativo dessas enzimas. As serpinas também funcionam como falsos substratos que se ligam forte e covalentemente à enzima, causando alteração conformacional significativa no inibidor e quebra do sítio ativo da protease (Otlewski *et al.*, 2005).

A literatura que aborda o papel dos inibidores de serinoproteases no desenvolvimento tumoral é vasta e complexa. Como o intuito deste trabalho é investigar a ação de um inibidor de serinoprotease do tipo kunitz, a literatura apresentada a seguir se restringiu às ações deste tipo de inibidor e a carcinogênese.

1.2.1 Inibidores de serinoproteases do tipo Kunitz

Os domínios tipo Kunitz são constituídos por pequenas moléculas ligadas a dissulfetos (cerca de resíduos com 50 aminoácidos), encontrados em uma grande variedade de proteases, sendo que os domínios melhores caracterizados são os presentes nos inibidores de serinoproteases (Corral-Rodriguez *et al.*, 2009). Estes domínios são estruturas funcionais comumente encontradas em proteínas secretadas no espaço extracelular, que em geral, estão relacionadas à inibição canônica/reversível de serinoproteases. Os inibidores que apresentam um ou dois domínios do tipo kunitz são glicoproteínas transmembrana, que podem exercer efeito proteolítico na superfície da membrana ou ainda apresentar um papel regulatório intermolecular na superfície celular (Ribeiro *et al.*, 2008).

Está bem estabelecido, que existem proteínas inibidoras de serinoproteases de domínio Kunitz único, como o (*bovine pancreatic trypsin inhibitor* BPTI), mas também podem ser encontradas proteínas com três domínios Kunitz consecutivos, como é o caso do principal inibidor endógeno da cascata de coagulação (*tissue factor pathway inhibitor* TFPI). O TFPI afeta a hemostasia durante a etapa inicial da cascata de coagulação, inibindo o fator Xa, pela interação com seu 2º domínio Kunitz, e, assim, bloqueando o complexo FVIIa/Fator tissular, via seu 1º domínio Kunitz. Além disso, o TFPI-2, estruturalmente homólogo ao TFPI, exerce funções importantes na manutenção da estabilidade do microambiente tumoral, inibindo a invasão tecidual, crescimento de neoplasias, bem como a formação de metástases (Sierko *et al.*, 2007). Em conjunto, os dados acima exemplificam o papel catalítico dos domínios tipo kunitz na hemostasia e na gênese de doenças, como a coagulação sanguínea e o câncer (Ribeiro *et al.*, 2008; Batista *et al.*, 2010).

A contribuição dos inibidores de serinoproteases do tipo Kunitz no desenvolvimento tumoral vai além de uma atuação direta na matriz extracelular, inibindo a atividade proteolítica de serinoproteases. Tem sido mostrado, por

exemplo, que o TFPI modifica a expressão de genes relacionados à oncogênese, angiogênese, apoptose, invasão e metástase (Chand *et al.*, 2004)

A invasão tumoral depende de uma atividade proteolítica altamente regulada que permite a invasão da matriz extracelular pelas células tumorais. Dentre as enzimas participantes do processo, estão os ativadores de plasminogênio (plasminogen activators, PA), cuja expressão é regulada por diversas citocinas e fatores de crescimento com ação pró-inflamatória. Estudos recentes mostram que o Bikunin, um inibidor de serinoproteases do tipo Kunitz, inibe a invasão tumoral e a formação de metástases por ação direta na atividade da plasmina e pela inibição da expressão gênica e protéica do ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA). Além disso, este inibidor também atua de maneira indireta, inibindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF-alfa) e a interleucina 1beta (IL-1beta), essenciais para manutenção do microambiente e da angiogênese tumoral (Kobayashi *et al.*, 2003; Matsuzaki *et al.*, 2004; Kanayama *et al.*, 2007).

A expressão e ativação de inibidores de serinoproteases do tipo kunitz têm uma relação inversa com a malignidade dos processos cancerosos o que implica, geralmente, em prognóstico favorável ao paciente. A literatura descrita acima, embora que não tenha abrangido a toda a vasta literatura sobre o papel dos inibidores de serinoproteases tipo kunitz, mostra seu papel relevante na carcinogênese. Os mecanismos envolvidos são complexos, justamente pela ampla magnitude de ação destes inibidores.

1.3 Amblyomin-X

Atualmente, tem sido demonstrado que inúmeras moléculas bioativas são secretadas pelas glândulas salivares de carrapatos que afetam a hemostasia (cascata de coagulação, agregação plaquetária e fibrinólise). Estas moléculas com propriedades anticoagulantes presentes na saliva destes artrópodes são imprescindíveis para que ocorra o repasto sanguíneo, pois mantém o sangue do hospedeiro fluído, facilitando a alimentação. (Francischetti *et al.*, 2009; Guedes *et al.*, 2005; Mans & Ribeiro, 2008a; Mans & Ribeiro, 2008b). Além disso, alguns ectoparasitas apresentam importância médica e veterinária por parasitar animais domésticos e silvestres como o carrapato *Amblyomma cajennense* que pertence à

família *Ixodidae*, subfamília *Amblyomminae*. Este carrapato é o responsável pelo maior número de picadas em humanos e o principal vetor da febre maculosa, causada pela *Rickettsia rickettsii* (Horta *et al.*, 2004; Guedes *et al.*, 2005; Mans & Ribeiro, 2008a; Mans & Ribeiro, 2008b)

O grupo de Chudzinski-Tavassi, do Instituto Butantan, que recentemente vem estudando o carrapato *Amblyomma cajennense*, descreveu uma biblioteca de ESTs (expressed sequence tags; (Batista *et al.*, 2008) representando os genes presentes nas glândulas salivares do carrapato *Amblyomma cajennense* e, a partir desta coleção de genes foi estabelecido o perfil dos transcritos mais expressos pela glândula do carrapato. Dentre os genes transcritos encontrados nessa biblioteca, um deles apresentava homologia com inibidores de proteases do tipo Kunitz, com características que se assemelhavam a inibidores de FXa, e por isso, este gene foi eleito para clonagem e expressão. Este gene foi expresso em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris* e a proteína recombinante foi denominada Amblyomin-X. Este material recebeu este nome por ser originário das glândulas salivares do *Amblyomma cajennense* e por se tratar de um inibidor do Fator Xa da coagulação (Batista *et al.*, 2010).

Estudos experimentais com a proteína recombinante têm mostrado sua capacidade de inibir o Fator Xa da coagulação e, conseqüentemente interferir com a hemostasia, prolongando o tempo de coagulação (Batista *et al.*, 2010); de ativar a atividade fagocítica de macrófagos; de induzir morte celular por apoptose em diferentes linhagens tumorais, como as de melanomas murino e humano e de possuir efeito antitumoral *in vivo*. Este último efeito pode estar relacionado à possível atividade anti-angiogênica da molécula. Esta evidência está baseada nas observações que camundongos tratados com o Amblyomin-X, por via intraperitoneal, apresentaram redução da massa tumoral no tecido subcutânea dorsal induzida pela injeção de células de melanoma da linhagem B16-F10 (Chudzinski-Tavassi *et al.* 2010). A evidência da ação da proteína sobre a angiogênese foi sugerida pela menor formação de vasos na região que circunda o tumor (Chudzinski-Tavassi, comunicação pessoal). Desta forma, estudos que elucidem os mecanismos do Amblyomin-X na redução da formação do tumor, entre os quais a angiogênese, poderá contribuir para a utilização desta proteína como ferramenta terapêutica.

2. Angiogênese no desenvolvimento tumoral

Dados prospectivos provenientes da Organização Mundial da Saúde indicam que o câncer será uma das principais causas de morte no mundo. Nos Estados Unidos aproximadamente meio milhão de pessoas são diagnosticadas com câncer por ano (Jemal *et al.*, 2006; Welch & Black, 2010). Frequentemente este diagnóstico ocorre somente em estágio avançado da doença, quando já há a presença de metástases, indicando um prognóstico desfavorável ao paciente. O início da metástase é caracterizado pelo desprendimento de células neoplásicas malignas de um foco primário, invasão tumoral em tecido periférico e disseminação dessas células por meio de vasos sanguíneos e linfáticos para órgãos secundários (Kessenbrock *et al.*, 2010). A propagação das células tumorais é imprescindível para a evolução do câncer, porém os mecanismos moleculares envolvidos neste processo ainda não estão completamente elucidados. Contudo, sabe-se que tanto para inicialização e crescimento da massa tumoral primária, como para a formação das metástases, é necessário o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos no microambiente tumoral (Makrilia *et al.*, 2009).

O desenvolvimento de novos vasos ocorre por dois processos distintos, denominados: vasculogênese e angiogênese. A vasculogênese é a formação dos primeiros vasos sanguíneos através da diferenciação e migração de células mesenquimais pluripotentes (células progenitoras hemangiogênicas). Estas células se diferenciam em: células progenitoras hematopoiéticas e células progenitoras angioblásticas, que originam as células do sangue e os vasos sanguíneos, respectivamente (Pavlov *et al.*, 2009; Demir *et al.*, 2010).

A vasculogênese ocorre principalmente durante o desenvolvimento embrionário e fetal, no entanto, o recrutamento de angioblastos provenientes do sangue periférico e medula óssea em resposta a isquemia, também pode contribuir para a formação de novos vasos sanguíneos na fase adulta (Ahn *et al.*, 2009).

O plexo vascular primário formado durante a vasculogênese é utilizado como base para o desenvolvimento de novos vasos pela angiogênese. Portanto, por meio deste processo a rede vascular primária sofre uma remodelagem, combinando eventos de morte e regressão vascular com a sobrevivência e ramificação de capilares a partir de vasos pré- existentes, sendo deste modo, formado uma malha vascular altamente organizada (Nussenbaum & Herman, 2010).

A angiogênese é essencial para embriogênese e desenvolvimento do embrião; reprodução; para o sucesso de cicatrizações; transplantes de tecidos e regeneração tecidual; na formação de massas tumorais e metástases de células neoplásicas; entre outros (Karamysheva *et al.*, 2008). O processo de angiogênese, pelos motivos supracitados, tem sido alvo de estratégias terapêuticas em inúmeras doenças. Em casos de transplantes e regeneração de tecidos, o crescimento de novos sistemas microvasculares é uma das maiores limitações e, assim, o favorecimento do processo pode auxiliar no sucesso do tratamento (Tsopanoglou & Maragoudakis, 2007).

Por outro lado, a terapia anti-angiogênica tem sido empregada como estratégia no tratamento do câncer, em especial os muito invasivos. Embora, o câncer seja a doença dependente de angiogênese mais extensivamente estudada, outras condições patológicas também apresentam essa dependência. Dentre elas a psoríase, endometriose, degeneração macular, artrite reumatóide e aterosclerose (Nussenbaum & Herman, 2010). Por essa razão, muitos estudos são encontrados na literatura e diversas moléculas foram desenvolvidas com este intuito, estando em diferentes fases de testes pré-clínicos e clínicos (Kesisis *et al.*, 2007; Cole & Jayson, 2008). Atualmente, novas drogas têm sido aprovadas pelo FDA para o tratamento de doenças angiogênese- dependentes; Avastin® – câncer colorretal; Tarceva® – câncer de pulmão, e Lucentis® – degeneração macular (Folkman *et al.*, 2006).

A inicialização do processo tumoral é caracterizada pelo acúmulo de massa avascular composta por células do hospedeiro que proliferam atipicamente (Papetti & Herman, 2002). Primeiramente, tumores sobrevivem e se desenvolvem no sistema vascular pré-existente. No entanto, para o tumor ultrapassar 2–3 mm³ é necessário o suprimento sangüíneo contínuo, responsável pela remoção de metabólitos e fornecimento de nutrientes as células tumorais. Portanto, para que ocorra evolução e ampliação do tamanho tumoral, a angiogênese deve ocorrer pois a distância limite para a difusão do oxigênio do vaso para que a célula mantenha suas funções metabólicas e biológicas é de 150 a 200 µm do vaso (Folkman & Hochberg, 1973; Kempen & Leenders, 2006).

Angiogênese é um processo altamente dinâmico e complexo, caracterizado por uma seqüência coordenada de interações humorais e celulares (Carmeliet *et al.*,

1997;Risau, 1997;Carmeliet & Jain, 2000;Carmeliet, 2000) (Bergers & Benjamin, 2003), como descrito seqüencialmente abaixo:

(1) Inicialmente, há aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação de capilares pré existentes ou vênulas pós-capilares em resposta a mediadores como o VEGF e NO;

(2) Remoção dos pericitos do endotélio dos vasos pré-existentes que posteriormente irão sofrer remodelação;

(3) Degradação da membrana basal e da matriz extracelular;

(4) Migração das células endoteliais do tipo *tips cells* para o espaço perivascular, em resposta a um gradiente de estímulo liberado pelo tumor ou células residentes, como por exemplo, o VEGF;

(5) Proliferação das células endoteliais;

(6) Migração, das células endoteliais, que recentemente proliferaram, na matriz extracelular. Esta migração é organizada em forma de colunas, onde as células aderem uma as outras, criando um lúmen;

(7) A formação do lúmen é acompanhada pelo estabelecimento e reforço das comunicações e contatos entre células endoteliais, formação da membrana basal e mobilização dos pericitos e células musculares lisas para junto do endotélio;

(8) Amadurecimento do sistema e início da circulação sanguínea no novo vaso.

Figura 1. Etapas da Angiogênese. Adaptado de Bergers & Benjamin, 2003.

Durante a angiogênese, células endoteliais adquirem características heterogêneas quanto à morfologia, função e expressão gênica. Estudos recentes têm demonstrado a importância do ajuste específico e coordenado do comportamento destas células para que a formação dos novos vasos ocorra com êxito. (Hellstrom *et al.*, 2007; Lobov *et al.*, 2007; Siekmann & Lawson, 2007).

O início da angiogênese é liderado e guiado por células endoteliais exploratórias, *tip cells*, que se ligam intimamente a células endoteliais que se dividem e formam o novo lúmen vascular, denominadas *stalk cells* (Ruhrberg *et al.*, 2002; Gerhardt *et al.*, 2003). As *tip cells*, como já salientado, são as células inicializadoras da angiogênese e são caracterizadas pela sua localização na extremidade do espalhamento vascular; por responder ao VEGF-A que especificamente direciona sua migração e altera suas propriedades adesivas; pela capacidade de emitir protusões de filapódios para anastomose dos capilares; e por secretar componentes que degradam a matriz extravascular (Dorrell *et al.*, 2002). Atualmente, está bem estabelecido que o fenótipo adquirido pelas *tip cells* durante o desenvolvimento vascular é transitório, além de ser induzido e mantido pela interação do VEGF-A com o receptor 2 para o VEGF (VEGFR-2), expresso em altas concentrações por estas células (Mato *et al.*, 1989; Leslie *et al.*, 2007). Apesar desta mesma interação VEGF-A/VEGFR-2 resultar na proliferação das células que migram secundariamente (*stalks cells*) para formar o novo capilar, não induz a proliferação das *tip cells* (Gerhardt *et al.*, 2003; Karamysheva, 2008). Portanto, fica evidente que as células líderes (*tip cells*) e as células seguidoras (*stalk cells*) respondem diferentemente à ativação do VEGFR-2.

Assim como os receptores para o VEGF (VEGFRs) são importantes para ativar vias intracelulares que resultam na seleção das células endoteliais para a angiogênese, receptores *Notch* e seus ligantes também demonstram papel fundamental para a escolha destas células (Hellstrom *et al.*, 2007). Até o momento, foram descritos 4 receptores *Notch* (1, 2, 3 e 4) que interagem com seus ligantes transmembrana (*jagged 1*, *jagged 2*, *Delta like ligand 1*, 3, 4) e participam da regulação do recrutamento das *tip cells*.

A interação entre *Delta like ligand 4* (Dll4) e os receptores *Notch 1* e *4*, regula negativamente a etapa inicial da angiogênese pois mantém as células em estado quiescente. Vários estudos demonstram que a ativação dos receptores *Notch 1* pelo ligante Dll4 previne a seleção excessiva de *tip cells*, no entanto, células endoteliais que não expressam estes receptores adquirem fenótipo de *tip cells*, implicando em aumento da formação, ramificação e fusão dos túbulos endoteliais recém formados. Recentemente, sabe-se que existe uma interação dinâmica e auto-regulatória entre as vias de sinalização do VEGF e do Dll4. A expressão de Dll4 é induzida pela sinalização VEGF-A/ VEGFR2 ou por hipóxia, resultando em inibição celular adjacente em que as células se mantêm em estado quiescente. Além disso, a sinalização pelo complexo Dll4/receptores *Notch* regula positivamente a expressão de VEGFR-2, principal mediador angiogênico durante o desenvolvimento vascular (Suchting *et al.*, 2007; Roca & Adams *et al.*, 2010).

A inexistência das últimas etapas da angiogênese (formação da parede vascular e amadurecimento do novo vaso) limita o processo, uma vez que os torna muito frágeis e propícios à ruptura, onde é impossível suportar a passagem de sangue. Logo, para um vaso sanguíneo ser estável, funcional e estar protegido contra a ruptura e deformação são necessários lâmina basal, pericitos e músculo liso.

Pericitos, também conhecidos como células murais ou periendoteliais, são derivados do tecido embrionário mesenquimal e são encontrados, principalmente, na membrana basal dos vasos sanguíneos, em especial em vênulas pós-capilares. Embora o papel dos pericitos não esteja totalmente estabelecido, sabe-se que essas células participam da manutenção do tônus vascular, maturação e consolidação dos vasos recém formados além de regular a quiescência das células endoteliais. Alguns estudos sugerem que os pericitos são precursores de células da musculatura lisa vascular, além de apresentarem propriedades pluripotentes das células-tronco, que lhes permitem estar envolvidos na regeneração tecidual (Peault *et al.*, 2007; Sainson & Harris, 2008).

Neste contexto, células da musculatura lisa vascular também são fundamentais para a estabilização dos vasos recém formados, pois inibem a migração e proliferação das células endoteliais. Além disso, a presença das células

da musculatura lisa vascular sobre a lâmina basal do endotélio impede a regressão de vasos que foram formados recentemente (Conway *et al.*, 2001).

Ademais, a matriz extracelular também é essencial para a manutenção e desenvolvimento vascular não só por proporcionar fisicamente o suporte aos vasos durante o seu crescimento, mas também por armazenar e mobilizar peptídeos vasoativos, fatores de crescimento e citocinas que medeiam importantes vias de sinalização durante a angiogênese (Arroyo *et al.*, 2010).

2.1 Permeabilidade Vascular e Angiogênese

O sistema vascular tem a função crítica de suprir os tecidos com nutrientes, bem como remover metabólitos e produtos residuais dos mesmos. Para tanto, os vasos devem ser suficientemente permeáveis para permitir passagem livre, bidirecional de pequenas moléculas e gases e, em menor grau, de proteínas plasmáticas. O intercâmbio de substâncias entre vasos e tecidos é regulado, majoritariamente, pela permeabilidade vascular, que desempenha papel relevante sobre diversos processos fisiopatológicos, tais como: filtração glomerular, regeneração tecidual, inflamação, angiogênese, câncer e formação de metástases (London *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009).

A regulação da permeabilidade vascular, assim como da angiogênese, está intimamente relacionada com a interação entre VEGFs e seus receptores, VEGFRs. VEGF-A, originalmente descrito por Senger (1983), como fator de permeabilidade vascular (VPF), ao interagir com seus receptores (VEGFR-1/VEGFR-2) controla a permutação das moléculas, induzindo a formação de fenestrações, cavéolas, organelas vesicovacuolares e poros transendoteliais. A permeabilidade estimulada pelo VEGF é dependente da ativação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) com conseqüente produção de óxido nítrico (NO). A indução desta enzima requer a ativação prévia da fosfolipase C- γ e influxo de cálcio, ou ainda, a fosforilação direta da eNOS pela proteína kinase B/AKT. Além disso, os VEGFRs também podem ser ativados de maneira ligante independente, pela formação de um complexo mecanossensório formado pelas moléculas de adesão *platelet-endothelial cell adhesion molecule* (PECAM-1), *vascular-endothelial cadherin* (VE-caderina),

VEGFRs e integrinas, que exerce papel fundamental no ajuste da permeabilidade vascular (Olsson *et al.*, 2006; Bates *et al.*, 2010).

Durante as etapas iniciais da angiogênese a vasodilatação e o incremento da permeabilidade vascular em resposta ao NO e ao VEGF, são processos essenciais para que haja um maior aporte celular e humoral nos nichos pré-angiogênicos, favorecendo a formação de novos vasos. A hiperpermeabilidade vascular também é característica de processos cancerosos que, geralmente, são acompanhados por inflamação e angiogênese, apresentando, portanto, papel relevante na progressão do câncer e na formação de metástases (Nagy *et al.*, 2008)

2.2 Aderência e Migração das células endoteliais

A interação adesiva célula-célula e célula-matriz extracelular é importante não só por ancorar fisicamente as células vasculares no substrato, em que ocorrerá a angiogênese, mas também por ativar sistemas de sinalização intracelular, que regulam as diferentes funções das células endoteliais. Portanto, esta interação controla, essencialmente, a sobrevivência e a migração dessas células durante a angiogênese (Ramjaun & Hodivala-Dilke, 2009).

A capacidade das células endoteliais migrarem, aderirem à matriz extravascular e proliferarem é dependente, entre outros fatores, da expressão de moléculas de adesão na membrana celular, que medeiam adesão homotípica e/ou heterotípica. Estas moléculas, na maioria das vezes, são receptores glicoprotéicos, constitutivamente expressos na membrana celular, estocados em grânulos intracelulares ou sintetizados frente à estimulação de diferentes origens. Além de mediar aderência, as moléculas de adesão sinalizam para eventos intracelulares (*focal adhesion kinase*-FAK, *nuclear factor kappa-B* NF- κ B, MAPK/ERK) necessários para o processo de angiogênese (Rao *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2007).

Na angiogênese, a interação de fatores de crescimento aos seus receptores na célula endotelial promove expressões de moléculas de adesão, como das β 3 integrinas (α 1 β 3; α 1 β 5), PECAM-1; *intercelular adhesion molecule-1* (ICAM-1); *vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1) e *endothelial cadherin* (E-caderina) (Hsu *et al.*, 2007; Szekanecz & Koch, 2005; Dimaio *et al.*, 2008; Hofer & Scweighofer, 2007), que medeiam as interações homo e heterotípicas necessárias para migração celular. Tem sido amplamente demonstrado que o bloqueio farmacológico da

expressão ou atividade destas moléculas com antagonistas ou anticorpos monoclonais reduz a mobilidade das células endoteliais, inibindo a angiogênese (Hsu *et al.*, 2007; Bhasker *et al.*, 2007; Lafrenie *et al.*, 2007). Diante disso, é evidente que a regulação fina e ajustada da aderência da célula endotelial em matriz extracelular é fundamental para que ocorra migração das células endoteliais.

A migração orientada das células endoteliais envolve seqüencialmente: (1) resposta a um fator quimiotáxico (2) protusão e extensão da borda celular (3) aderência dos contatos focais (4) rearranjo do citoesqueleto (5) destacamento da borda traseira da célula (6) deslocamento dos contatos focais e (7) reciclagem dos componentes adesivos. Os eventos supracitados, que convergem para a migração das células endoteliais, podem ser coordenados por uma série de agentes que ativam/inativam receptores e vias intracelulares. Dentre estas vias se destacam: GTPases, *phosphatidylinositol 3-kinases* (PI3K), *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS), p38MAKquinase e *focal adhesion kinase* (FAK) (Lamallice *et al.*, 2007).

Recentemente, foi estabelecida uma nova rota de sinalização intracelular (MEK5/ERK5) que culmina na regulação da migração e adesão focal das células endoteliais. Diferentemente das ERK1/2, a ERK5 apresenta um amplo domínio C-terminal, esta característica estrutural lhe confere funções biológicas e mecanismos regulatórios que a difere dos outros membros da família MAPK (*mitogen activated protein kinase*). Este sistema de sinalização pode ser ativado por fatores de crescimento (VEGF, FGF-2, *endothelial growth factor* - EGF), citocinas (IL6), além de estresse oxidativo e osmótico, que podem gerar ativação das fibras de actina, alteração organizacional do citoesqueleto e conseqüentemente, rearranjos morfológicos na célula, que são cruciais para a mobilidade e o espalhamento celular durante a angiogênese (Sawhney *et al.*, 2008; Spiering *et al.*, 2009).

O exposto acima, embora que resumidamente, mostra a complexidade da angiogênese e a importância da célula endotelial neste processo. Um ajuste fino e complexo orquestrado por mediadores químicos, entre os quais os fatores de crescimento, citocinas, PGE2 e NO, medeiam as capacidades locomotoras e de orientação, adesivas, proliferativas e secretórias da célula endotelial. Interferências nestes eventos celulares modificam a angiogênese.

2.3 Mediadores químicos da angiogênese

2.3.1 Papel do VEGF

O VEGF e sua cascata de sinalização são reguladores chave na angiogênese, sendo um fator de sobrevivência para células endoteliais *in vivo* e *in vitro*. Os membros que compõe a família do VEGF são glicoproteínas diméricas, secretadas, e de aproximadamente 40kD. Portanto, são típicos fatores pró – angiogênicos, mediadores essenciais da angiogênese, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (Baeriswyl & Christofori, 2009).

VEGF-A é membro de uma família de fatores de crescimento que inclui PlGF (fator de crescimento placentário), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E, os quais se ligam a seus receptores tirosina quinase (VEGFR-1,-2,-3) com afinidades e especificidades variáveis (Ferrara et al., 2003)

Os VEGFs desempenham seus efeitos biológicos pela interação direta com receptores localizados nas membranas celulares que pertencem à superfamília dos receptores tirosina – quinase (RTK). Estes receptores são expressos predominantemente, mas não exclusivamente, em células endoteliais. Os principais receptores que medeiam angiogênese e linfangiogênese são VEGFR-2 e VEGFR-3, uma vez que, células endoteliais vasculares expressam primariamente VEGFR1 e VEGFR2 enquanto células endoteliais linfáticas expressam VEGFR-2 e VEGFR-3. Além disso, a expressão de VEGFRs tem sido demonstrada em carcinomas humanos e em outras condições patológicas (Carmeliet *et al.*, 2005). Atualmente, está bem estabelecido que o VEGFR-2, quando ligado ao VEGFA, consiste no principal mediador angiogênico, mitogênico e quimiotático durante a angiogênese fisiológica ou patológica.

Assim como outros receptores de fatores de crescimento tirosina- quinase, VEGFRs, quando interagem com seus ligantes, sofrem dimerização e, dependendo das propriedades de ligação destes ligantes, estes receptores podem formar homo ou heterodímeros. A dimerização aciona a ativação da quinase que, subsequentemente, autofosforila os resíduos de tirosina e induz a transdução de sinais, a partir de moléculas sinalizadoras. Estas moléculas (PLC, PI3K, Src, Akt, Ras e MAPK) amplificam as vias de sinalização, resultando em: migração;

sobrevivência; proliferação; adesão celular; regulação da permeabilidade vascular (Olsson *et al.*, 2006).

Assim sendo, é evidente a ação do VEGF como um dos mais potentes agentes angiogênicos, mediando ações na célula endotelial em todas as etapas do processo. É importante ressaltar que o processo de angiogênese é mediado por uma série de outros agentes químicos endógenos e que a participação do VEGF foi salientada nesta Introdução, uma vez que este estímulo foi empregado para esclarecer os efeitos do Amblyomin-X sobre a migração das células endoteliais.

2.3.2 Papel da PGE2

Sabe-se que a inflamação crônica é um processo crítico para a progressão do tumor, envolvendo uma vasta rede de substâncias (citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento entre outras) que medeiam este processo. Dentre estes mediadores, a ciclooxigenase-2 é considerada uma enzima com atividade pró-angiogênica e tumoral, principalmente, pela ação de seu metabólito, PGE2 (Alfranca *et al.*, 2008).

Estudos experimentais têm delineado o mecanismo molecular utilizado pela PGE2. Neste contexto, tem sido mostrado que este mediador interage com seus receptores transmembrana (EP-1, EP-2, EP-3 e EP4), que pertencem à clássica família dos receptores acoplados à proteína G, ativando uma cascata de sinalização intracelular, que resulta em: supressão da resposta imune, inibição de apoptose, proliferação e migração celular, angiogênese e invasão tecidual (Wang & DuBois, 2006).

Tem sido verificado que a super-expressão da ciclooxigenase-2, que caracteriza processos neoplásicos, é acompanhada por maior expressão e produção de: fatores pró-angiogênicos, VEGF e o fator de crescimento de fibroblastos – 2 (FGF-2), metaloproteases de matriz (MMP), ligantes de remodelamento vascular (angiopoietinas) e receptores de adesão da família das integrinas (Larkins *et al.*, 2006).

Embora a ação da PGE2 sobre a angiogênese associada ao tumor esteja bem descrita, pouco se sabe sobre a atividade de prostanóides no processo de formação de novos vasos, fora do contexto do crescimento tumoral. Estudos prévios têm mostrado que a PGE2 induz angiogênese a partir da ativação dos receptores

EP-2 e EP-4 em células endoteliais vasculares humanas (Namkoong *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2007). A ativação destes receptores induz um aumento nos níveis intracelulares de AMPc e ERK1/2, envolvidos em diferentes vias de sinalização intracelular. Recentemente, foi demonstrado que o receptor EP-4 exerce papel fundamental na migração *in vitro* (dependente de PGE2), que é mediada pela ativação da via de sinalização ERK1/2 (Rao *et al.*, 2007).

Com base nestes estudos, e em outros estudos aqui não citados, mas que corroboram as informações descritas acima, tem sido evidenciado que a PGE2 e seus receptores exibem modulação positiva na angiogênese, invasão tumoral e, conseqüentemente, na evolução do câncer.

2.3.3 Papel do NO

O NO constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas. Trata-se de um radical livre, gasoso, solúvel em água e lipídios, envolvido em eventos relacionados à progressão tumoral (angiogênese, apoptose, invasão e metástase) (Ying & Hofseth, 2007). Entretanto, esta molécula é caracterizada por desempenhar um papel ambíguo no contexto da evolução do tumor, podendo exercer efeitos pró e anti-tumorais (Heller, 2009).

Atualmente, sabe-se que altos níveis de produção de NO promovem citotoxicidade e apoptose em células tumorais, inibindo desse modo o crescimento do tumor e a formação de metástases. No entanto, está bem estabelecido que o NO trata-se de uma molécula sinalizadora chave em doenças reguladas pela inflamação, incluindo o câncer, e que uma resposta inflamatória exacerbada pode gerar espécies reativas de nitrogênio (NO), e, desta forma, favorecer a carcinogênese. Além disso, o NO endógeno pode aumentar ou manter o fluxo sangüíneo no microambiente tumoral, via vasodilatação das arteríolas, o que facilita o fornecimento de oxigênio e nutrientes para as células tumorais. Ainda, esta molécula pode diminuir a interação leucócito/endotélio nos vasos sangüíneos, diminuindo a resposta imune do hospedeiro frente ao tumor (Fukumura *et al.*, 2006).

O NO, além de participar efetivamente do desenvolvimento tumoral, também pode atuar indiretamente neste processo, por operar como 2º mensageiro de fatores de crescimento (VEGF/FGF-2) que regulam a angiogênese. Esta molécula contribui, significativamente, com o estado pró-angiogênico das células endoteliais por

desencadear migração, proliferação e diferenciação celular. Estes efeitos ocorrem pela ativação da e-NOS constitutiva, com conseqüente elevação do GMP cíclico (cGMP), que promove a ativação de MAPK, resultando na expressão de FGF-2 (Namba *et al.*, 2003; Ziche & Morbidelli, 2004).

Assim como na progressão tumoral, o NO também apresenta papel dúbio na formação de novos vasos, podendo atuar como um mediador angiostático ou pró-angiogênico (Frischer, & Malik, 1996). Foi demonstrado que células endoteliais vasculares apresentam maior mobilidade e capacidade de aderência em baixas concentrações de NO, pela ativação de PKC, ERK e fosforilação de c-Jun, enquanto que altas concentrações desse mediador inibem estes efeitos (Jones *et al.*, 2004).

Diversos trabalhos foram publicados abordando a importância do NO como mediador da angiogênese e da progressão tumoral. Pelo exposto, fica evidente que este radical exerce papel modulador na migração, proliferação e sobrevivência das células endoteliais, processos imprescindíveis para que a angiogênese ocorra com êxito. Neste contexto, o óxido nítrico parece ser um alvo promissor pela busca de estratégias terapêuticas anti-angiogênicas (Ziche & Morbidelli, 2004; Heller, 2009).

3. OBJETIVOS

As serinoproteases são relevantes para a formação de metástases neoplásicas e o mecanismo proposto consiste na participação destas enzimas na remodelagem tecidual, migração celular, invasão das células tumorais além de favorecer a formação de novos vasos que irrigam a massa tumoral. Visto a importância do controle das proteases na instalação e progressão do tumor, a interferência na expressão e atividade destas enzimas tem sido alvo terapêutico para o tratamento do câncer. Assim, estudos com inibidores de serinoproteases são freqüentes na literatura, bem como a busca de novas moléculas eficazes para este fim.

Venenos de alguns animais são ricos em enzimas proteolíticas e seus inibidores. Muitos desses componentes são empregados como fonte para novas moléculas com finalidade diagnóstica ou terapêutica. Neste contexto, foi clonado um inibidor de serinoprotease do tipo kunitz, a partir da construção de uma biblioteca de cDNA das glândulas salivares do carrapato *Amblyomma cajannense*, o Amblyomin-X. Dentre as ações do Amblyomin-X investigadas, foi observado sua ação anti-tumoral *in vivo*, embora os mecanismos de suas ações ainda não estão esclarecidas.

Com base nas informações citadas acima, além da angiogênese ser processo fundamental para instalação e sobrevivência das células tumorais, neste trabalho, a capacidade do Amblyomin-X interferir com o processo de angiogênese foi investigada em ensaios *in vivo* e as suas ações sobre funções da célula endotelial, bem como sobre a toxicidade sobre a célula tumoral B16F10 foram avaliadas *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram empregados camundongos Swiss machos (20-30g; 3 a 4 meses). Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e foram mantidos em condições normais de biotério até o início dos experimentos. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA; Protocolo número: 212,19 de fevereiro de 2009). Antes dos experimentos relatados a seguir, os animais foram anestesiados pela mistura de ketamina/xilazina, 100 e 20mg/kg respectivamente.

4.2 Obtenção do Amblyomin-X

O Amblyomin-X foi fornecido pelo grupo da Dra Ana Marisa Chudzinski-Tavassi, do Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan. O *Amblyomin-X* foi produzido pelo processo fermentativo em bioreator de 10L, empregando-se leveduras da espécie *Pichia pastoris*. A obtenção e a purificação é realizada no laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, em sistema escalonável e validado utilizando o equipamento Äkta Purifier - 950 (GE Healthcare) e uma coluna XK 26/20 (GE Healthcare Bio-Sciences AB – 56101179. AC – 18-1000-72 - lote 4430341 - Sweden) preenchida com 50 mL de resina aniônica SOURCETM 15-Q.

4.3 Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF)

Foi utilizado o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) recombinante (eBioscience; 34-8351-85) específico para receptores de VEGF. Este foi diluído em PBS à 4°C e utilizado nas doses e concentrações de 1 a 100 ng/10µL, topicamente ou por poço.

4.4 Culturas celulares

Células t-End

Foram empregadas células endoteliais obtidas de hemangioma de timo de camundongos C57BL6 que foram transformadas por poliovírus, segundo descrito por Williams *et al.*, (1988). Aliquotas das células desta linhagem (t-End) foram mantidas em DMSO e soro fetal bovino (SFB, Vitrocell[®]) a -80°C até o momento de uso. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Vitrocell[®]) com 10% de SFB em estufa de CO₂, a 37°C. As culturas foram empregadas nos ensaios após o segundo repique. Esta linhagem foi gentilmente doada pela Dra. Catarina de Fátima Pereira Teixeira do Instituto Butantan.

Células de melanoma da linhagem B16-F10

Esta linhagem foi cedida pelo grupo da Dra Ana Marisa Chudzinski-Tavassi, do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan. Aliquotas das células desta linhagem (B16-F10) foram mantidas em DMSO e soro fetal bovino a -80°C até o momento de uso. As células foram cultivadas a 37°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂, em placas de cultura plásticas contendo meio RPMI 1640 acrescido com 10% de soro fetal bovino (SFB; Vitrocell[®]). Após o 4º repique as culturas foram utilizadas para realização dos protocolos experimentais.

4.5 Ensaio de angiogênese in vivo: modelo da câmara dorsal

Implante cirúrgico da câmara dorsal

O tecido dorsal dos camundongos foi depilado com creme depilatório (Veet®) e manipulações cirúrgicas na pele foram realizadas para implantação das câmaras dorsais (Institute for Surgycal Research, University of Munich, Germany) conforme descrito por Harder *et al.*, (2004). As imagens seqüenciais ilustrativas da preparação tecidual estão mostradas na **Figura 2**.

Figura 2. Manipulação cirúrgica para implantação da câmara dorsal em camundongos. Após anestesia, os animais foram depilados e sua pele dorsal foi presa por fios de sutura para permanecer completamente esticada. Inicialmente a placa traseira da câmara é inserida, com seus respectivos parafusos. Posteriormente, a camada frontal da pele é retirada, na região onde ficará o visor de vidro da câmara, permitindo assim, uma perfeita visualização da microcirculação. A câmara dorsal é presa por pontos de fio de sutura em sua parte superior.

Dia 01	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 06	Dia 07	Dia 08	Dia 09	Dia 10	Dia 11
Implante da câmara					Amblyomi n-X	Amblyo min-X	Amblyomi n-X	Amblyo min-X	Sacrifício dos animais
	Injeção de células B16F10								
	Captura das imagens	Captura das imagens	Captura das imagens	Captura das imagens	*Captura das imagens	Captura das imagens	Captura das imagens	Captura das imagens	*Captura das imagens

Captura das imagens: As imagens foram adquiridas sem fluorescência

*Captura das imagens: As imagens foram adquiridas com e sem fluorescência

Aquisição e análise das imagens

A microscopia intravital é uma técnica utilizada para o estudo da dinâmica dos eventos da microcirculação em animais vivos, pela observação direta da rede microvascular de tecidos transiluminados ou não em monitores de TV e/ou de computador. Os camundongos foram acondicionados em caixa de contenção e as imagens da rede microcirculatória do tecido subcutâneo dorsal foram obtidas por câmera digital (Sony – Cyber-shot – 7.2 Mega pixels/Optical 3x) ou por microscópio óptico (Carl-Zeiss, Axioplan II) acoplado a câmera digital (Carl-Zeiss, Axiocam HRC) e transmitidas por uma câmera de projeção de imagem (ZVS, 3C75DE, Carl-Zeiss), ligadas ao microscópio, para monitores de TV ou de computador.

As imagens fluorescentes da área tecidual contendo os vasos da microcirculação foram obtidas após injeção intravenosa (via plexo retro-orbital) de 200µL de Isotiocianato de fluoresceína, 50mg/mL (FITC; Sigma®) ligado a albumina. A fluorescência foi captada por microscopia de fluorescência com filtros calibrados para a emissão de 520nm (LT-520) e excitação de 450 à 490nm (BP 450-490).

Os aumentos proporcionados pelas objetivas do microscópio, pela optovar (sistema adicional de ampliação de imagem localizado no microscópio) e pela câmera de projeção de imagem conferem ampliação e nitidez suficiente para as análises quali e quantitativas da angiogênese nas telas dos monitores de TV e do computador. O computador possui um programa de análise de imagem (Axio vision 4, Carl-Zeiss) que permite análises quantitativas das imagens digitalizadas.

A quantificação do número de vasos na microcirculação foi realizada nas imagens capturadas nos diferentes intervalos de tempo, empregando uma malha digital, que permitiu a padronização das imagens e a quantificação precisa dos números de vasos em cada segmento da malha. Esta técnica foi adaptada a partir da técnica descrita por Dellian *et al.*, (1996). Além disso, a quantificação do desenvolvimento tumoral foi avaliada pela área do tumor formado, analisada pelo software de análise de imagens (Axio vision 4, Carl-Zeiss).

4.6 Avaliação da permeabilidade vascular

O efeito do Amblyomin-X sobre a permeabilidade vascular foi estudado de acordo com o modelo estabelecido por (Senger, 1990). Inicialmente, o dorso dos animais foi depilado e as áreas utilizadas para a mensuração do extravasamento vascular foram demarcadas (máximo de 6 sítios/camundongo). Em seguida, os animais foram submetidos à injeção intravenosa (via plexo retro-orbital) de 200µL do corante Azul de Evans (20mg/kg; Sigma®).

Após 10 minutos, na região dorsal dos animais, foram realizadas injeções intradérmicas de PBS, VEGF (100ng/sítio), que funcionou como fator intensificador da permeabilidade vascular, ou Amblyomin-X (10, 100 e 1000ng/sítio) na presença ou ausência de VEGF. Após 30 minutos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as áreas delimitadas, anteriormente, foram removidas e pesadas em balança analítica. A quantidade do corante extravasado nos fragmentos de pele foi extraída em Formamida (MERCK®), por 24 horas, e mensurada quantitativamente por espectrofotometria.

Os valores da absorbância foram aferidos fazendo a leitura teste no comprimento de onda de 620nm e a leitura de referência no comprimento de onda de 690 nm. ($DO = DO_{620nm} - DO_{690nm}$).

4.7 Avaliação de migração da célula endotelial

O efeito do Amblyomin-X sobre a mobilidade da célula endotelial foi estudado em modelo bidimensional e tridimensional pelo emprego de células endoteliais de microcirculação murinas da linhagem t-End.

Modelo bidimensional

O ensaio de migração das células endoteliais bidimensional foi realizado de acordo com o modelo estabelecido por Burk, (1973) de cicatrização *in vitro*. Inicialmente, 5×10^5 células foram plaqueadas em placas de cultura de 35 mm. Após as culturas se tornarem confluentes, foi realizada uma lesão na monocamada unicelular com o auxílio de um *cell scraper* e as células foram lavadas com PBS. Em seguida, foi adicionado meio RPMI 1640 (Vitrocell®), sem soro, na ausência ou presença de Amblyomin-X (10, 100 ou 1000ng/poço). Cada cultura foi incubada por um período de 6 ou 12 horas e após este período, o número de núcleos celulares que atravessaram a linha demarcada foi quantificado em três campos microscópicos distintos.

Modelo tridimensional

O modelo tridimensional foi realizado em câmara de Boyden, com membrana de policarbonato, isenta de polivinilpirrolidona (Milipore), com poros de 20 μ m de diâmetro e cobertos com Matrigel® (Becton, Dickinson and Company). Para tanto, células endoteliais foram cultivadas até o 3º repique e sincronizadas em meio carenciado (RPMI + 0,1% SFB), por 48 horas. 1×10^5 células foram ressuspensas em meio carenciado e adicionadas ao compartimento superior da câmara de Boyden na ausência ou presença de Amblyomin-X (10, 100 ou 1000ng/compartimento superior). O compartimento inferior da câmara de Boyden foi preenchido com meio carenciado na presença ou ausência de solução de VEGF, na concentração de 100ng/mL, que funcionou como fator quimiotático. As câmaras foram, então, incubadas a 37 °C por 24 horas e as células que atravessaram o filtro, presentes no compartimento inferior, foram ressuspensas e quantificadas em câmara de Neubauer.

4.8 Avaliação de aderência da célula endotelial

Após as células endoteliais (t-End) atingirem confluência, estas foram tratadas por 2 horas com meio RPMI 1640, sem soro, na ausência ou presença de Amblyomin-X (10, 100 ou 1000ng/poço). Com auxílio de cell scraper, as células endoteliais foram removidas, contadas e adicionadas a uma placa de 96 poços (5×10^4 células/poço) e a aderência em Matrigel® (Becton, Dickinson and Company) foi permitida por um período de 30 minutos, a 37 °C. Após o término do período de aderência das células endoteliais, o meio de cultura (RPMI 1640) foi removido e as células foram cuidadosamente lavadas com solução de PBS, por duas vezes. A solução de lavagem foi removida dos poços e 100 µL de uma solução 0,1% de corante cristal violeta (**20% metanol; v/v**) foram adicionados a cada poço, por 10 minutos a temperatura ambiente. Após o término da incubação, o corante cristal violeta foi cuidadosamente aspirado e cada poço foi lavado 4 vezes com água deionizada. A camada celular foi dissolvida pela adição de 100 µL/poço de uma solução de solubilização (ácido acético 50% em água). Os valores da absorbância foram aferidos fazendo a leitura teste no comprimento de onda de 580nm e a leitura de referência no comprimento de onda de 690 nm. (DO = DO 580nm - DO 690nm). Os resultados foram expressos em porcentagem relativa ao grupo controle.

4.9 Determinação de mediadores químicos

Determinação da concentração de nitrito (NO_2^-) no sobrenadante de células endoteliais

Células endoteliais (t-End) foram cultivadas na presença ou ausência de Amblyomin- X (10,100 ou 1000ng/mL) por 24 horas. A concentração de NO_2^- foi determinada no sobrenadante das culturas celulares utilizando a reação de Griess. Em resumo, 100µL dos sobrenadantes das culturas celulares foram adicionados a 100µL do reagente de Griess (1% de sulfanilamida em meio ácido com 0,1% de α -naftil etilenodiamina; Sigma-Aldrich, preparado no momento do uso). Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, a absorbância de cada amostra foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 550nm. A concentração de NO_2^- das amostras foi determinada a partir de uma curva padrão de NaNO_2 (0,2 – 200µM).

Determinação da concentração de prostaglandina E2 (PGE2) no sobrenadante de células endoteliais

Células endoteliais (t-End) foram cultivadas na presença ou ausência de Amblyomin- X (10,100 ou 1000ng/mL) por 24 horas. A concentração de PGE2 foi determinada no sobrenadante das culturas celulares utilizando ensaio imunoenzimático competitivo, seguindo metodologia do fabricante (Kit Prostaglandin E2 Express EIA /Cayman/USA). Em resumo, 50µL dos sobrenadantes das culturas celulares foram adicionados a 100µL do reagente de trabalho (anticorpo monoclonal anti-PGE2 + PGE2 conjugada à acetilcolinesterase) em uma microplaca de 96 poços e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 150µL do substrato enzimático e após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, a absorbância de cada amostra foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 420nm. A concentração de PGE2 das amostras foi determinada a partir de uma curva padrão de PGE2 (15,6 pg/mL – 2000 pg/mL).

4.10 Determinação da viabilidade de células de melanoma da linhagem B16-F10

A viabilidade das células tumorais foi determinada em ensaios de citometria de fluxo, usando marcação com a proteína Anexina V e com iodeto de propídio (PI), para a mensuração de apoptose e necrose celular, respectivamente. Células B16-F10 (1×10^5) foram plaqueadas (com RPMI adicionado de SFB 10%) e posteriormente tratadas, diariamente, com PBS ou Amblyomin-X (10, 100 e 1000ng/mL) por 4 dias. Posteriormente, as células foram transferidas para tubos específicos para o ensaio de citometria de fluxo e incubadas com a proteína Anexina-V (conjugada com o fluorocromo FITC) diluída com tampão de ligação para anexina (1:100) e com 10µL de PI na concentração de 50µg/mL. Após 15 minutos de incubação, à temperatura ambiente, a solução tampão de ligação de anexina foi adicionada aos tubos e as amostras foram lidas em citômetro de fluxo FACS Calibur.

4.11 Análise estatística

Os resultados obtidos estão apresentados como média $\pm$ e.p.m. e analisados pelo Teste “t” de student ou pela Análise de Variância com comparações múltiplas (ANOVA), seguido do teste de Tukey-Kramer. As análises estatísticas foram realizadas usando o Programa Graph Pad Prisma, versão 5.0.

5. RESULTADOS

5.1 Efeitos da aplicação tópica do Amblyomin-X sobre a rede microcirculatória

Os resultados apresentados na **Figura 3** mostram que aplicação tópica do Amblyomin-X nas concentrações de 10, 100 ou 1000 ng/mL reduziu o número de vasos no tecido subcutâneo dorsal. O gráfico representa a porcentagem de aumento ou redução do número de vasos em relação ao número de vaso antes do início dos tratamentos com Amblyomin X ou com salina (controles). **As figuras 4, 5, 6 e 7** são as imagens representativas obtidas por microscopia intravital de animais tratados com solução salina, 10, 100 ou 1000 ng/mL de Amblyomin-X, respectivamente.

Figura 3. Variação do número de vasos do tecido subcutâneo dorsal de camundongos tratados topicamente com solução salina ou com Amblyomin-X (10, 100 ou 1000ng/mL). As imagens da rede microcirculatória foram obtidas antes e 6 dias após o início dos tratamentos, realizados a cada 48 horas. Os valores expressam a variação, em porcentagem, do número de vasos antes e no 6º dia após o início dos tratamentos de 4-6 animais por grupo. Os resultados representam a média $\pm$ e.p.m. ***P<0,001 vs salina.

Antes do tratamento

Após o tratamento

Figura 4. Efeito da aplicação tópica de solução salina sobre a rede microcirculatória dorsal de camundongos Swiss. As imagens foram capturadas por microscopia intravital antes e após (6 dias) o início do tratamento e analisadas pelo software de análise de imagens (Axio vision 4). As imagens da parte superior do painel representam a coloração normal do tecido, e as da parte inferior do painel, as mesmas imagens com inversão de cores.

Antes do tratamento

Após o tratamento

Figura 5. Efeito da aplicação tópica de uma solução (10 ng/mL) de Amblyomin-X sobre a rede microcirculatória dorsal de camundongos Swiss. As imagens foram capturadas por microscopia intravital antes e após (6 dias) o início do tratamento e analisadas pelo software de análise de imagens (Axio vision 4). As imagens da parte superior do painel representam a coloração normal do tecido, e as da parte inferior do painel, as mesmas imagens com inversão de cores.

Antes do tratamento

Após o tratamento

Figura 6. Efeito da aplicação tópica de uma solução (100 ng/mL) de Amblyomin-X sobre a rede microcirculatória dorsal de camundongos Swiss. As imagens foram capturadas por microscopia intravital antes e após (6 dias) o início do tratamento e analisadas pelo software de análise de imagem (Axio Vision 4). As imagens da parte superior do painel representam a coloração normal do tecido, e as da parte inferior do painel, as mesmas imagens com inversão de cores.

Antes do tratamento**Após o tratamento**

Figura 7. Efeito da aplicação tópica de uma solução (1000 ng/mL) de Amblyomin-X sobre a rede microcirculatória dorsal de camundongos Swiss. As imagens foram capturadas por microscopia intravital antes e após (6 dias) o início do tratamento e analisadas pelo software de análise de imagem (Axio Vision 4). As imagens da parte superior do painel representam a coloração normal do tecido, e as da parte inferior do painel, as mesmas imagens com inversão de cores.

5.2 Efeitos da aplicação tópica do Amblyomin-X sobre a rede microcirculatória na presença de células tumorais

5.2.1 Efeitos do tratamento simultâneo

A linhagem de células de melanoma murino (B16-F10) foi empregada para induzir o crescimento tumoral no tecido subcutâneo dorsal dos animais. Os resultados apresentados na **Figura 8** mostram que a aplicação tópica do Amblyomin-X nas concentrações de 10 ou 100 ng/mL não reduziu o número de vasos na presença de células B16-F10 na rede microcirculatória dorsal dos animais. Diferentemente, o tratamento com a concentração de 1000ng/mL de Amblyomin-X inibiu acentuadamente a formação de novos vasos na vigência do desenvolvimento de células tumorais no tecido subcutâneo dorsal. Os gráficos representam a porcentagem de aumento ou redução do número de vasos em relação ao número de vasos antes do início dos tratamentos com Amblyomin X ou com salina (controles) na vigência de crescimento de células tumorais. As **figuras, 9, 10, 11 e 12** são as imagens representativas obtidas por microscopia intravital de animais tratados com solução salina, 10, 100 ou 1000 ng/mL de Amblyomin-X, respectivamente

Os mesmos efeitos foram observados em ensaios adicionais, apresentados na **Figura 13**, onde foram empregadas técnicas de microscopia de fluorescência. As **Figuras 14 e 15** são as imagens representativas captadas por microscopia de fluorescência de animais tratados com solução salina e 1000ng/mL de Amblyomin-X, respectivamente.

Figura 8. Variação do número de vasos do tecido subcutâneo dorsal de camundongos tratados topicamente com solução salina ou com Amblyomin-X (10, 100 ou 1000ng/mL) na vigência do desenvolvimento de células cancerosas. As imagens da rede microcirculatória foram obtidas antes e 6 dias após o início dos tratamentos, realizados a cada 24 horas. Os valores expressam a variação, em porcentagem, do número de vasos antes e no 6º dia após o início dos tratamentos de 4-6 animais por grupo. Os resultados representam a média $\pm$ e.p.m. *** $P < 0,001$ vs salina.

Antes do tratamento

Após o tratamento

Figura 9. Efeito da aplicação tópica de solução salina sobre a rede microcirculatória dorsal de camundongos na vigência de células cancerosas. As imagens foram capturadas por microscopia intravital antes e após (6 dias) o início do tratamento e analisadas pelo software de análise de imagens (Axio vision 4).

Antes do tratamento

Após o tratamento

Figura 10. Efeito da aplicação tópica de solução (10ng/mL) de Amblyomin-X sobre a rede microcirculatória dorsal de camundongos Swiss na vigência de células cancerosas. As imagens foram capturadas por microscopia intravital antes e após (6 dias) o início do tratamento e analisadas pelo software de análise de imagem (Axio Vision 4).

Antes do tratamento **Após o tratamento**

Figura 11. Efeito da aplicação tópica de solução (100 ng/mL) de Amblyomin-X sobre a rede microcirculatória dorsal de camundongos Swiss na vigência de células cancerosas. As imagens foram capturadas por microscopia intravital antes e após (6 dias) o início do tratamento e analisadas pelo software de análise de imagem (Axio Vision 4).

Antes do tratamento **Após o tratamento**

Figura 12. Efeito da aplicação tópica de solução (1000 ng/mL) de Amblyomin-X sobre a rede microcirculatória dorsal de camundongos Swiss na vigência de células cancerosas. As imagens foram capturadas por microscopia intravital antes e após (6 dias) o início do tratamento e analisadas pelo software de análise de imagem (Axio Vision 4).

Figura 13. Variação do número de vasos do tecido subcutâneo dorsal de camundongos tratados topicamente com solução salina ou com 1000ng/mL de Amblyomin-X, na vigência do desenvolvimento de células cancerosas. As imagens da rede microcirculatória foram obtidas por microscopia de fluorescência antes e 6 dias após o início dos tratamentos, realizados a cada 24 horas. Os valores expressam a variação, em porcentagem, do número de vasos antes e no 6º dia após o início dos tratamentos de 4-6 animais por grupo. Os resultados representam a média $\pm$ e.p.m. ***P<0,001 vs salina.

Figura 14. Efeito da aplicação tópica de solução salina sobre a rede microcirculatória dorsal de camundongos Swiss na vigência de células cancerosas. As imagens foram capturadas por microscopia de fluorescência antes e após (6 dias) o início do tratamento e analisadas pelo software de análise de imagem (Axio Vision 4).

Antes do tratamento **Após o tratamento**

Figura 15. Efeito da aplicação tópica de solução (1000 ng/mL) de Amblyomin-X sobre a rede microcirculatória dorsal de camundongos Swiss na vigência de células cancerosas. As imagens foram capturadas por microscopia de fluorescência, antes e após (6 dias) o início do tratamento e analisadas pelo software de análise de imagem (Axio Vision 4).

5.3 Efeitos da aplicação tópica do Amblyomin-X sobre a instalação e desenvolvimento de tumor no tecido subcutâneo dorsal dos animais

5.3.1 Efeitos do tratamento simultâneo

Os dados obtidos no presente trabalho mostraram que o tratamento com Amblyomin-X, nas concentrações de 10 ou 100ng/mL, não alterou o perfil de implantação do tumor, visível a partir do terceiro dia após a injeção das células cancerosas, e a área do tumor, mensurada no 8º dia após a implantação, foram equivalentes em animais tratados com solução salina ou com 10 ou 100ng/mL de Amblyomin-X (**figuras 17, 18 e 19**). Diferentemente, o tratamento com a concentração de 1000ng/mL de Amblyomin-X inibiu a implantação e reduziu marcadamente a evolução do tumor (**figuras 16 e 20**).

Figura 16. Área do tumor induzido pela aplicação de células da linhagem de melanoma murino B16F10 ($10^5/5\mu\text{L}$) no tecido subcutâneo dorsal de camundongos, tratados topicamente com solução salina ou com Amblyomin-X (10, 100 ou 1000ng/mL). As imagens da rede microcirculatória foram obtidas no 8º dia após a implantação das células cancerosas. Os tratamentos foram realizados a cada 24 horas desde a implantação das células cancerosas até 24 horas antes do sacrifício. Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de 4-6 animais por grupo. *** $P < 0,001$ vs salina.

3 dias após injeção

4 dias após injeção

5 dias após injeção

6 dias após injeção

7 dias após injeção

8 dias após injeção

Figura 17. Evolução da massa tumoral induzida pela injeção subcutânea de células de melanoma murino da linhagem B16F10 ($10^5/5\mu\text{L}$) no dorso de camundongos, tratados com solução salina, topicamente, a cada 24 horas desde a implantação das células cancerosas até 24 horas antes do sacrifício. As imagens foram capturadas em microscopia intravital e quantificação da área do tumor foi realizada pelo software de análise de imagem (Axio vision 4).

Figura 18. Evolução da massa tumoral induzida pela injeção subcutânea de células de melanoma murino da linhagem B16F10 ($10^5/5\mu\text{L}$) no dorso de camundongos, tratados com solução de Amblyomin-X na concentração de 10ng/mL , topicamente, a cada 24 horas desde a implantação das células cancerosas até 24 horas antes do sacrifício. As imagens foram capturadas em microscopia intravital e quantificação da área do tumoral foi realizada pelo software de análise de imagem (Axio vision 4).

Figura 19. Evolução da massa tumoral induzida pela injeção subcutânea de células de melanoma murino da linhagem B16-F10 ($10^5/5\mu\text{L}$) no dorso de camundongos, tratados com solução de Amblyomin-X na concentração de 100ng/mL , topicamente, a cada 24 horas desde a implantação das células cancerosas até 24 horas antes do sacrifício. As imagens foram capturadas em microscopia intravital e quantificação da área do tumoral foi realizada pelo software de análise de imagem (Axio vision 4).

3 dias após injeção

4 dias após injeção

5 dias após injeção

6 dias após injeção

7 dias após injeção

8 dias após injeção

Figura 20. Evolução da massa tumoral induzida pela injeção subcutânea de células de melanoma murino da linhagem B16-F10 ($10^5/5\mu\text{L}$) no dorso de camundongos, tratados com solução de Amblyomin-X na concentração de 1000ng/mL, topicamente, a cada 24 horas desde a implantação das células cancerosas até 24 horas antes do sacrifício. As imagens foram capturadas em microscopia intravital e quantificação da área do tumoral foi realizada pelo software de análise de imagem (Axio Vision 4).

5.3.2 Efeitos do tratamento posterior

Com o objetivo de investigar se o tratamento com Amblyomin-X após a instalação do tumor poderia influenciar a evolução do mesmo, o tratamento foi inicializado três dias após a injeção das células cancerosas, quando as imagens mostravam o início do tumor. Os resultados da **Figura 21** mostram que nenhuma das concentrações empregadas reduziu a área do tumor, uma vez que as áreas tumorais foram equivalentes em todos os grupos de animais testados. **As figuras 22 e 23** são as imagens representativas da evolução tumoral em animais tratados com salina ou com 1000ng/mL de Amblyomin-X, respectivamente.

Figura 21. Área do tumor induzido pela aplicação de células B16-F10 ($10^5/5\mu\text{L}$) no tecido subcutâneo dorsal de camundongos, tratados posteriormente à aplicação das células cancerosas e topicamente com solução salina ($10\mu\text{L}$) ou com Amblyomin-X (10, 100 ou 1000ng/mL). As imagens da rede microcirculatória foram obtidas no 8º dia após a implantação das células cancerosas. Os tratamentos foram realizados a cada 24 horas no terceiro dia após a injeção das células cancerosas até 24 horas antes do sacrifício. Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de 4-6 animais por grupo.

Figura 22. Evolução da massa tumoral induzida pela injeção subcutânea de células de melanoma murino da linhagem B16-F10 ($10^5/5\mu\text{L}$) no dorso de camundongos, tratados com solução salina, topicamente, a cada 24 horas, no terceiro dia após a injeção de células cancerosas até 24 horas antes do sacrifício. As imagens foram capturadas em microscopia intravital e quantificação da área do tumoral foi realizada pelo software de análise de imagem (Axio Vision 4).

3 dias após injeção

4 dias após injeção

5 dias após injeção

6 dias após injeção

7 dias após injeção

8 dias após injeção

Figura 23. Evolução da massa tumoral induzida pela injeção subcutânea de células de melanoma murino da linhagem B16-F10 ($10^5/5\mu\text{L}$) no dorso de camundongos, tratados com Amblyomin-X (1000ng/mL), topicamente, a cada 24 horas, no terceiro dia após a injeção de células cancerosas até 24 horas antes do sacrifício. As imagens foram capturadas em microscopia intravital e quantificação da área do tumor foi realizada pelo Software de análise de imagem (Axio Vision 4).

5.4 Efeitos do Amblyomin-X sobre a permeabilidade vascular

Os resultados apresentados na **Figura 24** demonstram que o tratamento com Amblyomin-X (10, 100 e 1000 ng/sítio) não alterou a permeabilidade vascular em condições basais ou na vigência do estímulo (VEGF- 100ng/sítio).

Figura 24. Efeitos do Amblyomin-X sobre a permeabilidade vascular. Camundongos foram submetidos à injeção intravenosa do corante Azul de Evans. Em seguida, na região dorsal dos animais, foram realizadas injeções intradérmicas de PBS, VEGF (100ng/sítio) e Amblyomin-X (10, 100 e 1000ng/sítio) na vigência ou ausência de VEGF. Os efeitos dos tratamentos com Amblyomin-X sobre o processo de permeabilidade vascular foram mensurados pela quantificação do corante extravasado por espectrofotometria (620 nm). Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m de 4-5 ensaios para cada tratamento * $P < 0,01$ e ** $P < 0,001$ vs PBS.

5.5 Efeitos do Amblyomin-X sobre a migração de células endoteliais

5.5.1 Modelo bidimensional

O tratamento com Amblyomin-X não modificou a capacidade das células migrarem nas primeiras 6 horas de observação, no entanto reduziu significativamente o número de células que migraram no período até 12 horas de observação. Os dados estão apresentados na **figura 25** e as imagens representativas estão ilustradas na **figura 26**.

Figura 25. Efeitos do tratamento com Amblyomin-X sobre a migração de células t-End na monocamada unicelular. Após confluência, as células foram tratadas com Amblyomin-X (10, 100 e 1000ng/mL) ou com solução salina e uma lesão na monocamada foi realizada por um cell scrapper e o número de células que migraram para esta área foi quantificado por microscopia invertida. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m de 4-5 ensaios para cada tratamento ***P< 0,001 e **P<0,01 vs salina.

Figura 26. Imagem representativa do ensaio de migração celular no modelo da monocamada antes e 12 horas após os tratamentos. (A) células tratadas com solução salina; (B) células tratadas com 10ng/mL de Amblyomin-X; (C) células tratadas com 100ng/mL de Amblyomin-X; (D) células tratadas com 1000ng/mL de Amblyomin-X.

5.6 Efeitos do Amblyomin-X sobre a migração das células endoteliais em condições basais e na vigência de estímulo pelo VEGF

5.6.1 Modelo bidimensional

Os resultados apresentados na **Figura 27** mostram que o tratamento com VEGF induziu aumento na capacidade de migração celular e que o tratamento com Amblyomin-X não afetou esta migração. Confirmando os dados mostrados anteriormente, o Amblyomin-X somente afetou a migração em condições basais, mas não alterou a migração celular induzida pelo VEGF.

Figura 27. Efeitos do tratamento com Amblyomin-X sobre a migração de células t-End na monocamada unicelular em condições basais ou após estímulo pelo VEGF. Após atingirem confluência, as células foram tratadas com salina ou Amblyomin-X (10, 100, 1000ng/mL) na presença ou ausência de VEGF e uma lesão na monocamada foi realizada por um cell scraper e o número de células que migraram para esta área foi quantificado por microscopia invertida. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m de 4-6 ensaios por grupo de tratamento. # $P < 0,01$, * $P < 0,01$ e ** $P < 0,001$ vs salina.

5.6.2 Modelo tridimensional

A análise da migração celular em modelo experimental mais complexo, que incorpora Matrigel a um filtro de polycarbonato, mostrou que a migração frente ao VEGF foi marcadamente maior que a observada na ausência deste estímulo. Os resultados representados pela **Figura 28** mostram que o tratamento com o Amblyomin-X só afetou a capacidade de migração celular em condições basais, ou seja na ausência de VEGF.

Figura 28. Efeitos do tratamento com Amblyomin-X sobre a migração de células t-End no modelo de Matrigel® associado a filtro de polycarbonato em condições basais ou após estímulo pelo VEGF. Após atingirem confluência, as células foram tratadas com salina ou Amblyomin-X (10,100,1000ng/mL) na presença ou ausência de VEGF e a migração foi quantificada após 24 horas em câmara de Neubauer. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m de 4-5 ensaios por tratamento. **P<0,01 e ***P<0,001 vs salina e # P<0,001 vs respectivos valores basais.

5.7 Efeitos do Amblyomin-X sobre a aderência da célula endotelial em Matrigel®

Os resultados apresentados na **Figura 29** demonstram que o tratamento com Amblyomin-X na concentração de 10ng/mL não afetou a capacidade de aderência celular em Matrigel®. Entretanto, o tratamento com Amblyomin-X nas concentrações de 100 ou 1000ng/mL inibiu significativamente a aderência das células endoteliais no substrato.

Figura 29. Efeitos do tratamento com Amblyomin-X sobre a aderência de células t-End em Matrigel®. Células t-End confluentes foram tratadas por 2 horas com Amblyomin-X ou com solução salina e a aderência em Matrigel® foi monitorada após um período de 30 minutos. Os efeitos do tratamento com Amblyomin-X sobre o processo de aderência celular foram mensurados por espectrofotometria (580nm). Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m de 4-5 ensaios para cada tratamento ***P< 0,001 vs salina.

5.8 Efeitos do Amblyomin-X sobre a concentração de nitrito (NO_2^-) no sobrenadante de células endoteliais

Em condições basais, o tratamento com Amblyomin-X nas concentrações de 10, 100 ou 1000 ng/mL não alterou as concentrações de NO_2^- no sobrenadante das culturas de células endoteliais. Os resultados apresentados na **Figura 30** mostram que nenhuma das concentrações empregadas de Amblyomin-X alterou o perfil de produção de óxido nítrico por células endoteliais.

Figura 30. Efeitos do tratamento com Amblyomin-X sobre a produção de óxido nítrico pelas células t-End. Células endoteliais foram cultivadas na presença ou ausência de Amblyomin-X por 24 horas e a produção de óxido nítrico foi determinada no sobrenadante por reação de Griess. Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de 4-5 ensaios para cada tratamento.

5.9 Efeitos do Amblyomin-X sobre a secreção de prostaglandina E2 (PGE2) pelas células endoteliais

A figura 31 demonstra que o tratamento com Amblyomin-X nas concentrações de 10, 100 ou 1000ng/mL não alterou a produção de prostaglandina E2 a partir de sobrenadante coletado de cultura de células endoteliais, em condições basais.

Figura 31. Efeitos do tratamento com Amblyomin-X sobre a secreção de prostaglandina E2 pelas células t-End. Células endoteliais foram cultivadas na presença ou ausência de Amblyomin-X por 24 horas e a secreção de prostaglandina E2 foi determinada no sobrenadante por ensaio imunoenzimático. Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de 4-5 ensaios para cada tratamento.

5.10 Efeitos do Amblyomin-X sobre a viabilidade de células de melanoma murino da linhagem B16-F10

Os efeitos do Amblyomin-X sobre a viabilidade das células B16-F10 foram investigados por ensaios de citometria de fluxo após a incubação diária destas células com a proteína nas concentrações de 10, 100 ou 1000ng/mL por um período de 4 dias. Os dados obtidos demonstraram que o Amblyomin-X, nas concentrações empregadas, não apresentou toxicidade para esta linhagem celular, uma vez que a porcentagem de células viáveis foi similar nos grupos estudados (**Figura 32**). As células não apresentaram marcação para Anexina V (apoptose) ou para PI (necrose) (dados não mostrados).

Figura 32 Efeitos do Amblyomin-X sobre a viabilidade de células de melanoma murino da linhagem B16-F10. Estas células (1×10^5 /poço) foram incubadas com PBS ou com as diferentes concentrações de Amblyomin-X(10,100,1000ng/mL) a 37°C em atmosfera úmida e 5% de CO₂, por 4 dias. A viabilidade celular foi aferida pela incubação com Anexina-V e/ou PI e a intensidade de fluorescência foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de células de dois ensaios independentes.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar os possíveis efeitos e mecanismos de ação de um inibidor de serinoprotease, clonado a partir da construção de uma biblioteca de cDNA das glândulas salivares do carrapato *Amblyomma cajannense*, sobre a formação de novos vasos. Os dados obtidos mostraram que a aplicação local de Amblyomin-X reduziu o número de vasos da rede microcirculatória na vigência ou ausência de crescimento de células tumorais (B16-F10), e que este efeito pode ser dependente, pelo menos em parte, da ação desta proteína sobre os processos de migração e aderência da célula endotelial.

Para a avaliação da cinética de crescimento dos novos vasos foi utilizado o modelo experimental da câmara dorsal em camundongos. Esta metodologia tem sido amplamente empregada para o estudo de novas moléculas com papel na angiogênese e, em especial na formação de tumores, uma vez que pode ser empregada em mamíferos, as imagens da microcirculação podem ser comparadas antes e após os tratamentos e estes podem ser realizados localmente ou via sistêmica. Em conjunto, estas características conferem vantagens para esta metodologia sobre as demais técnicas *in vivo* utilizadas para o estudo da angiogênese (Staton *et al.*, 2009).

Os dados inicialmente obtidos mostraram que a aplicação tópica do Amblyomin-X sobre a rede microcirculatória dos camundongos reduziu o número de vasos, em condições basais, pois nenhum estímulo indutor de angiogênese foi empregado. No entanto, é importante salientar que a manipulação cirúrgica para implantação da câmara causa inflamação, visualizada por alguns pontos de edema e hemorrágicos, que diminuem consideravelmente após o segundo dia de implantação. Este foi o motivo pelo qual os tratamentos com Amblyomin-X e veículo foram iniciados após este período.

Para investigar os efeitos do Amblyomin-X sobre a formação de novos vasos na área que circunda o tumor, este foi induzido pela aplicação de células da linhagem de melanoma murino B16-F10, que apresenta elevada característica metastática e aderente, além de alto potencial de sobrevivência e crescimento (Fidler *et al.*, 1976). Devido ao conhecimento bem estabelecido de suas características morfológicas, bioquímicas e moleculares, essa linhagem tem sido empregada como um dos modelos celulares mais utilizados na pesquisa de câncer,

tanto no estudo de efeitos de compostos anti-carcinogênicos quanto na elucidação dos mecanismos de ação dos mesmos (Nicolson *et al.*, 1985).

Em nossos estudos, a padronização da concentração de células cancerosas B16-F10, injetadas no tecido subcutâneo dorsal dos camundongos, foi realizada em 3 concentrações distintas, com base na literatura existente (Yoysungnoen *et al.*, 2008; Koehl *et al.*, 2009). A concentração escolhida foi a de $10^5/5\mu\text{L}$, pois proporcionou a avaliação das etapas cinéticas do desenvolvimento tumoral, desde a instalação até a progressão do tumor. Desse modo, essa concentração de células cancerosas foi considerada a ideal para se avaliar em fase do processo de angiogênese o tratamento com Amblyomin-X seria mais efetivo. A concentração de 10^4 células/ $5\mu\text{L}$ causou instalação tumoral retardada, aproximadamente 10 dias, tornando inviável a manutenção da câmara dorsal em camundongos por período de tempo tão prolongado. Por outro lado, a concentração de 10^6 células/ $5\mu\text{L}$ causou instalação e progressão tumoral exageradamente rápida e agressiva.

Os efeitos do tratamento com Amblyomin-X sobre a rede microcirculatória na presença de células cancerosas foram investigados em 2 delineamentos experimentais distintos:

- a) Início do tratamento com Amblyomin-X, simultaneamente à injeção de células cancerosas B16-F10;
- b) Início do tratamento com Amblyomin-X, 3 dias após a injeção de células cancerosas B16-F10.

No primeiro delineamento experimental, o Amblyomin-X, na concentração de 1000ng/mL, inibiu a implantação do tumor, ou o seu retardo, bem como reduziu significativamente o número de vasos na área de injeção das células tumorais. Os mesmos efeitos foram observados quando as imagens da microcirculação foram capturadas por microscopia de fluorescência. Esta técnica foi empregada, posteriormente, pois confere melhor qualidade digital às imagens, propiciando uma quantificação mais apurada do número de vasos (Staton *et al.*, 2009; Koehl *et al.*, 2009).

Vale ressaltar que os dados obtidos pelo grupo da Dr^a Ana Marisa C. Tavassi têm mostrado que o Amblyomin-x induz a apoptose de células B16-F10 em cultura e que o tratamento sistêmico com o inibidor de serinoprotease, durante 14 ou 28 dias, promoveu remissão do tumor implantado no tecido subcutâneo dorsal dos animais

(Chudzinski-Tavassi *et al* 2010). É importante salientar que apesar dos dados apresentados no presente estudo terem sido obtidos após aplicação direta da proteína sobre a célula tumoral, as concentrações e os tempos de tratamentos empregados foram menores que os utilizados no tratamento sistêmico, realizado por Chudzinsky-Tavassi et al., 2010. Neste sentido, com o intuito de descartar uma possível ação citotóxica direta do Amblyomin-X sobre as células cancerosas, a maior concentração do Amblyomin-X utilizada neste trabalho foi aplicada sobre a cultura de células B16F10 por quatro dias consecutivos, mimetizando o esquema posológico realizado *in vivo*. Os resultados mostraram, claramente, que as concentrações de Amblyomin-X que, *in vivo*, inibiu a angiogênese e o crescimento de massa tumoral, não são tóxicas para as células cancerosas.

Com base nos resultados apresentados é possível, então, sugerir que o Amblyomin-X inibe ou retarda a instalação do melanoma por reduzir o número de vasos na malha vascular pré-existente, onde foram injetadas as células cancerosas.

Dando prosseguimento aos estudos, quando o tratamento com Amblyomin-X foi iniciado após a implantação das células tumorais, nenhuma das concentrações empregadas de Amblyomin-X (10, 100, 1000ng/mL) reduziu a área do tumor, e desta forma, a extensa massa tumoral formada não permitiu a quantificação do número de vasos que irriga o melanoma. Se comparados aos resultados obtidos quando o tratamento com Amblyomin-X foi iniciado em conjunto com a implantação das células cancerosas, pode se supor que o Amblyomin-X interfira com a formação de novos vasos na vigência do tumor, somente quando a instalação deste não está estabelecido completamente. Diferentemente, após a completa instalação do melanoma, o tratamento com Amblyomin-X não foi efetivo, provavelmente, pela presença de um microambiente tumoral já estável e consolidado, que exerceu alterações humorais e celulares, sobrepondo os efeitos inibitórios da proteína.

A permeabilidade vascular regula o intercâmbio celular e humoral entre os capilares e os tecidos, sendo imprescindível para o bom funcionamento do organismo. O desequilíbrio deste processo implica alterações em diversos processos fisiopatológicos, como: inflamação, angiogênese, câncer e formação de metástases. Comumente, estes processos são caracterizados por incremento da permeabilidade vascular. Assim, estudos com substâncias que alterem funcionalmente o endotélio,

prevenindo ou revertendo o extravasamento vascular são freqüentes na literatura, bem como a busca de novas moléculas eficazes para este fim (Wang *et al.*, 2009).

O aumento de vasodilatação e de permeabilidade vascular dos vasos próximos à área de implantação das células cancerosas, quer seja no tumor primário, ou nas metástases, são eventos importantes para aumentar a nutrição destas células, bem como para formar um ambiente propício para a intensa proliferação e metabolismo celular, quer seja das células cancerosas, ou das células presentes no microambiente tumoral (células endoteliais, macrófagos entre outras) (Mantovani *et al.*, 2010; Flavell *et al.*, 2010). Neste contexto, vale ressaltar que o VEGF causa intenso aumento de permeabilidade vascular e que, desta forma, é um dos mecanismos que favorecem a implantação de metástases (Kumar *et al.*, 2009). Por estas razões, investigamos neste trabalho se o Amblyomin-X exerceria seus efeitos anti-angiogênicos por ser um inibidor da permeabilidade vascular. Os resultados aqui obtidos corroboraram a ação do VEGF e mostraram que o Amblyomin-X não causa aumento de permeabilidade vascular, nem interfere com o aumento causado pelo VEGF *in vivo*.

Os inibidores de serinoproteases do tipo kunitz, como é o caso do Amblyomin-X, podem afetar a formação de novos vasos por diferentes mecanismos, como pela inibição da proliferação, migração e tubulogênese e pela indução de apoptose da célula endotelial (Islam *et al.*, 2009; Shakiba *et al.*, 2007; Kondraganti *et al.*, 2006). Com o intuito de esclarecer o efeito do Amblyomin-X sobre a formação de novos vasos, investigamos, num passo seguinte, a capacidade desta proteína afetar a migração e a aderência da célula endotelial.

Nos ensaios *in vitro*, a linhagem t-End foi proposta por ser uma linhagem de células endoteliais de microcirculação de camundongos, uma vez que os vasos da microcirculação participam da gênese de processos fisiopatológicos, como inflamação e angiogênese. Além disso, estudos *in vivo* e *in vitro* foram mantidos em uma mesma espécie animal.

O tratamento com Amblyomin-X afetou somente a migração de células endoteliais em condições basais. Este efeito foi mensurado em dois modelos experimentais, a saber: o modelo bidimensional (2D), que possibilita o monitoramento da migração das células endoteliais, permitindo uma estimativa da taxa de resposta migratória em diferentes intervalos de tempo (Pepper *et al.*, 1990) e

o tri-dimensional (3D), onde células endoteliais migram em direção a um estímulo quimiotático em câmara de Boyden modificada, admitindo uma avaliação quantitativa da mobilidade destas células (Alessandri *et al.* 1983). O modelo 3D oferece vantagens sobre o modelo 2D, pois emprega-se Matrigel® que simula o microambiente *in vivo*, além de poder ser utilizado para distinguir a quimiotaxia (migração direcionada em resposta a um gradiente de estímulo quimiotático) da quimiocinese (migração randômica), que pode ser observada no modelo 2D (Albini *et al.*, 2004; Staton *et al.*, 2009).

Em ambos os modelos, o Amblyomin-X inibiu a migração da célula endotelial na ausência de estímulo, mas por outro lado, não diminuiu a migração induzida pelo VEGF. A migração da célula endotelial mediada pela interação VEGF/VEGFR-2 resulta em fosforilação de proteínas, responsáveis pela ativação de moléculas de adesão e da redistribuição e organização de organelas intracelulares envolvidas na mobilidade celular. Dentre estas vias, tem sido bem estudado que a ligação do agonista ao VEGFR-2 leva à ativação de p38MAKquinases e PLC/PKC, que culminam com a migração celular (Olsson *et al.*, 2006). Desta forma, pode-se supor que o inibidor de serinoprotease aqui estudado, não interfere com a interação do fator de crescimento ao seu receptor e, possivelmente, com os mecanismos intracelulares subseqüentes. No entanto, este resultado é instigante já que a literatura mostra a ação de inibidores de serinoproteases sobre a migração endotelial evocada pelo VEGF (Shellenberger *et al.*, 2005). É importante também salientar que concentrações mais elevadas do Amblyomin-X poderiam provocar resultados distintos dos aqui apresentados e ensaios que elucidem esta hipótese serão realizados em breve.

Durante a interação heterotípica das células endoteliais com o substrato, essencial para a migração das *tip* e *stalk cells* e na interação homotípica para formação dos vasos, ocorre intensa sinalização intracelular que culmina na expressão/atividade de moléculas de adesão envolvidas nestes processos.

A adesão heterotípica é dependente, especialmente, da expressão/ativação das moléculas da família das integrinas. Após uma interação entre as células endoteliais e a matriz extracelular, estas moléculas ($\alpha v \beta 3$ integrina, $\alpha 5 \beta 1$ integrina) ativam diferentes mecanismos de sinalização intracelular *focal adhesion kinase*-

(FAK), *nuclear factor kappa-B* (NF- κ B), MAPK/ERK que resultam em adesão focal, sobrevivência, migração e proliferação celular (Ramjaun *et al.*, 2009).

Visto que o Amblyomin-X diminuiu a migração endotelial, pode-se supor que os mecanismos envolvidos na aderência destas células ao substrato poderiam ser alvo desse inibidor de serinoprotease. Assim, o efeito do Amblyomin-X sobre a aderência das células endoteliais foi investigado empregando-se Matrigel®, que é constituída basicamente por laminina, colágeno e proteoglicanas, mimetizando, desse modo, a composição de uma matriz extracelular. De fato, os dados obtidos comprovaram nossa hipótese, já que o tratamento com Amblyomin-X (100 e 1000ng/mL) diminui a aderência das células endoteliais neste substrato. Vale ressaltar que trabalho simultâneo do nosso grupo tem mostrado a capacidade do Amblyomin-X interferir com a expressão/atividade de moléculas de adesão envolvidas na interação homo e heterotípicas (Drewes, comunicação pessoal).

A migração das células endoteliais durante a angiogênese é coordenada por uma grande variedade de mediadores inflamatórios, dentre eles o NO e a PGE2. O NO é um mediador que pode exercer ação dúbia sobre a formação de novos vasos. Esta afirmação é amparada pelo fato da ativação/inibição de diferentes rotas de sinalização celular ser dependente de tempos de exposição e concentrações de NO distintas (Isenberg *et al.*, 2005). Enquanto, tem sido demonstrado que baixas concentrações de NO causam respostas pró-angiogênicas, altas concentrações induzem efeitos inibitórios (Urbich *et al.*, 2002). Por outro lado, a PGE2 de origem tumoral, ou ainda proveniente do endotélio, regula positivamente a angiogênese, induzindo fenômenos adesivos das células endoteliais durante a formação de novos vasos (Milkiewicz *et al.*, 2006). Por essas razões, o efeito do Amblyomin-X sobre a secreção desses mediadores pela célula endotelial foi investigado. Os dados obtidos demonstraram que o Amblyomin-X não interferiu com a secreção/liberação desses mediadores sugerindo, portanto, que estes não sejam mecanismos envolvidos no efeito do Amblyomin-X. Estes ainda podem dar suporte à ausência de efeitos do Amblyomin-X sobre a permeabilidade vascular observada *in vivo*, uma vez que ambos os mediadores químicos possuem papel relevante na vasodilatação e no aumento de permeabilidade vascular da microcirculação.

Em conjunto, embora os dados dos estudos *in vitro* ainda precisem de complementações, é evidente que o Amblyomin-X diminuiu a formação de novos

vasos *in vivo* e que afeta funções da célula endotelial que são relevantes para a angiogênese. Embora, seja possível que o Amblyomin-X possa alterar outros eventos da angiogênese, sua ação direta na migração e aderência da célula endotelial pode contribuir para os efeitos observados *in vivo*.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o Amblyomin-X inibe a angiogênese *in vivo* na presença ou ausência de células cancerosas (B16-F10) e a migração e aderência das células endoteliais (t-End) *in vitro*. Estas conclusões foram baseadas nos seguintes resultados:

- 1) Os estudos experimentais *in vivo* mostraram que a aplicação tópica de Amblyomin-X reduziu o número de vasos da rede microcirculatória na ausência ou vigência de crescimento de células tumorais;
- 2) Amblyomin-X reduziu a migração das células endoteliais (t-End) em dois modelos experimentais distintos (2D e 3D);
- 3) Amblyomin-X reduziu a aderência das células endoteliais (t-End) em modelo de Matrigel®;
- 4) Amblyomin-X não interferiu com a secreção de NO e PGE2 pelas células endoteliais;
- 5) Amblyomin-X não interferiu com a permeabilidade vascular na ausência ou vigência de VEGF;
- 6) Amblyomin-X não alterou a viabilidade das células de melanoma murino de linhagem B16-F10.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Affara, NI, Andreu, P & Coussens, LM. (2009). Delineating protease functions during cancer development. *Methods Mol Biol*, **539**, 1-32.

Ahn, OG & Brown, MJ. (2009). Role of endothelial progenitors and other bone marrow-derived cells in the development of the tumor vasculature. *Angiogenesis*, **12**, 159-164.

Albini, A, Benelli, R, Noonan, DM, Brigati, C. (2004). The "chemoinvasion assay": a tool to study tumor and endothelial cell invasion of basement membranes. *Int J Dev Biol*, **48** (5-6), 563-71.

Alfranca, A, López-Oliva, JM, Genís, L, López-Maderuelo, D, Mirones, I, Salvado, D, Quesada, AJ, Arroyo, AG, Redondo, JM. (2008). PGE2 induces angiogenesis via MT1-MMP-mediated activation of the TGFbeta/Alk5 signaling pathway. *Blood*, **112** (4), 1120-8.

Alessandri, G, Raju, K, Gullino, PM. (1983). Mobilization of capillary endothelium in vitro induced by effectors of angiogenesis in vivo. *Cancer Res*, **43** (4), 1790-7.

Arroyo, AG, Iruela-Arispe ML. (2010). Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovasc Res*, **86** (2), 226-35.

Baeriswyl, V & Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*, **19** (5), 329-37.

Bates, DO. (2010) Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. *Cardiovascular research*, **10**, 105-115.

Batista, IF, Chudzinski-Tavassi, AM, Faria, F, Simons, SM, Barros-Batesti, DM, Labruna, MB, Leao, LI, Ho, PL & Junqueira-de-Azevedo, IL. (2008). Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Toxicon*, **51**, 823-834.

Batista, IF, Ramos, OH, Ventura, JS, Junqueira-de-Azevedo, IL, Ho, PL & Chudzinski-Tavassi, AM. (2010). A new Factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. *Arch Biochem Biophys*, **493**, 151-156.

Bergers, B & Benjamin, LE. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev cancer*, **6**, 401-10.

Bertini, I, Fragai, M & Luchinat, C. (2009). Intra- and interdomain flexibility in matrix metalloproteinases: functional aspects and drug design. *Curr Pharm Des*, **15**, 3592-3605.

Bhasker, V, Zhang, D, Fox, M, Seto, P, Wong, MH, Wales, PE, Powers, D, Chao, DT, Dubridge, RB, Ramakrishnan, V. (2007). A function blocking anti-mouse integrin $\alpha 5 \beta 1$ antibody inhibits angiogenesis and impedes tumor growth in vivo. *J Transl. Med.* **5**, 61-70.

Brook, E, Herbert, AP, Jenkins, HT, Soares, DC & Barlow, PN. (2005). Opportunities for new therapies based on the natural regulators of complement activation. *Ann N Y Acad Sci*, **1056**, 176-188.

Burk, RR. (1973). A factor from a transformed cell line that affects cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **70**, 369-372.

Buttle, DJ. (2007). Factors controlling matrix turnover in health and disease. *Biochem Soc Trans*, **35**, 643-646.

Carmeliet, P, Moons, L, Dewerchin, M, Mackman, N, Luther, T, Breier, G, Ploplis, V, Muller, M, Nagy, A, Plow, E, Gerard, R, Edgington, T, Risau, W & Collen, D. (1997). Insights in vessel development and vascular disorders using targeted inactivation and transfer of vascular endothelial growth factor, the tissue factor receptor, and the plasminogen system. *Ann N Y Acad Sci*, **811**, 191-206.

Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, **6**, 389-395.

Carmeliet, P & Jain, RK. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, **407**, 249-257.

Carmeliet, P. (2005) VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, **69**, 4-10.

Cavalcanti, DM, Lotufo, CM, Borelli, P, Ferreira, ZS, Markus, RP & Farsky, SH. (2007). Endogenous glucocorticoids control neutrophil mobilization from bone marrow to blood and tissues in non-inflammatory conditions. *Br J Pharmacol*, **152**, 1291-1300.

Chand, HS, Schmidt, AE, Bajaj, SP & Kisiel, W. (2004). Structure-function analysis of the reactive site in the first Kunitz-type domain of human tissue factor pathway inhibitor-2. *J Biol Chem*, **279**, 17500-17507.

Chand, HS, Foster, DC & Kisiel, W. (2005). Structure, function and biology of tissue factor pathway inhibitor-2. *Thromb Haemost*, **94**, 1122-1130.

Chudzinski-Tavassi, AM, De Sá Júnior, PL, Simons, SM, Maria, DA, Ventura, JS, Batista, IFC, Faria, F, Durães, E, Reis, EM, Demasi, M. (2010). A new tick Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. *Toxicon*, **379**, 1-10.

Cole, CL & Jayson, GC. (2008). Oligosaccharides as anti-angiogenic agents. *Expert Opin Biol Ther*, **8**, 351-362.

Conway, ME, Collen, D, Carmeliet, P. (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular research*, **49**, 507-521.

Corral-Rodriguez, MA, Macedo-Ribeiro, S, Barbosa Pereira, PJ & Fuentes-Prior, P. (2009). Tick-derived Kunitz-type inhibitors as antihemostatic factors. *Insect Biochem Mol Biol*, **39**, 579-595.

Cuccioloni, M, Mozzicafreddo, M, Bonfili, L, Cekarini, V, Eleuteri, AM & Angeletti, M. (2009). Natural occurring polyphenols as template for drug design. Focus on serine proteases. *Chem Biol Drug Des*, **74**, 1-15.

Cudic, M & Fields, GB. (2009). Extracellular proteases as targets for drug development. *Curr Protein Pept Sci*, **10**, 297-307.

Dellian, M, Witwer, BP, Salehi, HA, Yuan, F & Jain, RK. (1996). Quantitation and physiological characterization of angiogenic vessels in mice: effect of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, and host microenvironment. *Am J Pathol*, **149**, 59-71.

Demir, R, Yaba, A, Huppertz, B. (2010). Vasculogenesis and angiogenesis in the endometrium during menstrual cycle and implantation. *Acta histochemica*, **112**, 203-214.

Dimaio, TA, Wang, S, Huang, Q, Scheef, EA, Sorenson, CM, Sheibani, N. Attenuation of retinal vascular development and neovascularization in PECAM-1-deficient mice. *Dev. Biol*, **315**(1), 72-88.

Dorrell, MI, Aguilar, E, Friedlander, M. (2002). Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **43** (11), 3500-10.

Ekici, OD, Paetzel, M, Dalbey, RE. Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein science*, **12**, 2023-37.

Eliceiri, BP, Paul, R, Schwartzberg, PL, Hood, JD, Leng, J & Cheresch, DA. (1999). Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell*, **4**, 915-924.

Ferrara, N. (2003). Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol*, **16**, 10-14.

Fidler, IJ & Nicolson, GL. (1976). Organ selectivity for implantation survival and growth of B16 melanoma variant tumor lines. *J Natl Cancer Inst*, **57** (5), 1199-202.

Flavell, RA, Sanjabi, S, Wrzesinski, Licon-Limon, P.(2010). The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF β . *Nature*, **10**, 554-568.

Folkman, J & Hochberg, M. (1973). Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med*, **138**, 745-753.

Folkman, J. (2003). Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med*, **3**, 643-651.

- Folkman, J. (2006). Angiogenesis. *Annual review of medicine*, **57**, 1-18.
- Francischetti, IM, Mather, TN & Ribeiro, JM. (2005). Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Thromb Haemost*, **94**, 167-174.
- Frischer, H, Malik, AB. (1996). Inhibition of endothelial cell proliferation and bFGF-induced phenotypic modulation by nitric oxide. *J Cell Biochem*, **63**, 125-34.
- Fry, B.G.; Roelants, K.; Champagne, D.E.; Scheib, H.; Tyndall, J.D.A.; King G.F.; Nevalainen, T.J., Norman, J., Lewis, R.J.; Norton, R.S.; Renjifo, C.; Rodríguez de la Vega, R.C. (2009) The Toxicogenomic Multiverse: Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **10**, 483–511.
- Fukumura, D, Kashiwagi, S, Jain, RK. (2006). The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, **6** (7), 521-34.
- Gerhardt, H, Golding, M, Fruttiger, M, Ruhrberg, C, Lundkvist, A, Abramsson, A, Jeltsch, M, Mitchell, C, Alitalo, K, Shima, D, Betsholtz, C. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*, **161**(6), 1163-77.
- Gille, H, Kowalski, J, Li, B, LeCouter, J, Moffat, B, Zioncheck, TF, Pelletier, N & Ferrara, N. (2001). Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem*, **276**, 3222-3230.
- Greene, CM & McElvaney, NG. (2009). Proteases and antiproteases in chronic neutrophilic lung disease - relevance to drug discovery. *Br J Pharmacol*, **158**, 1048-1058.
- Guedes, E, Leite, RC, Prata, MC, Pacheco, RC, Walker, DH & Labruna, MB. (2005). Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **100**, 841-845.
- Hao, Q, Wang, L, Zhao, ZJ & Tang, H. (2009). Identification of protein kinase D2 as a pivotal regulator of endothelial cell proliferation, migration, and angiogenesis. *J Biol Chem*, **284**, 799-806.
- Harder, Y, Amon, M, Erni, D & Menger, MD. (2004). Evolution of ischemic tissue injury In a random pattern flap: a new mouse model using intravital microscopy. *J Surg Res*, **121**, 197-205.
- Heller, A. (2009). The need for monitoring the actual nitric oxide concentration in tumors. *Bioanal Rev*, **1**, 3-6.
- Hellström, M, Phng, LK, Gerhardt, H. (2007). VEGF and Notch signaling: the yin and yang of angiogenic sprouting. *Cell Adhesion & Migration*, **1**(3), 133-6.

Hicklin, DJ & Ellis, LM. (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*, **23**, 1011-1027.

Hill, JM, Zalos, G, Halcox, JP, Schenke, WH, Waclawiw, MA, Quyyumi, AA & Finkel, T. (2003). Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*, **348**, 593-600.

Hofer, E & Schweighofer, B. (2007). Signal transduction induced in endothelial cells by growth factor receptors involved in angiogenesis. *Thromb Haemost*, **97**, 355-363.

Horta, MC, Labruna, MB, Sangioni, LA, Vianna, MC, Gennari, SM, Galvao, MA, Mafra, CL, Vidotto, O, Schumaker, TT & Walker, DH. (2004). Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Sao Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group *Rickettsia*. *Am J Trop Med Hyg*, **71**, 93-97.

Hsu, AR, Veeravagu, A, Cai, W, Hou, LC, Tse, V & Chen, X. (2007). Integrin alpha v beta 3 antagonists for anti-angiogenic cancer treatment. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, **2**, 143-158.

Hwang, SR, Bunday, R, Toneff, T & Hook, V. (2009). Endopin serpin protease inhibitors localize with neuropeptides in secretory vesicles and neuroendocrine tissues. *Neuroendocrinology*, **89**, 210-216.

Isenberg, JS, Ridnour, LA, Perruccio, EM, Espey, MG, Wink, DA, Roberts, DD. (2005) Thrombospondin-1 inhibits endothelial cell responses to nitric oxide in a cGMP-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102** (37), 13141-6.

Islam, MK, Tsuji, N, Miyoshi, T, Alim, MA, Huang, X, Hatta, T & Fujisaki, K. (2009). The Kunitz-like modulatory protein haemangin is vital for hard tick blood-feeding success. *PLoS Pathog*, **5**, e1000497.

Ivanciu, L, Gerard, RD, Tang, H, Lupu, F & Lupu, C. (2007). Adenovirus-mediated expression of tissue factor pathway inhibitor-2 inhibits endothelial cell migration and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **27**, 310-316.

Janciauskiene, S. (2000). Conformational properties of serine proteinase inhibitors confer multiple pathophysiological roles. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1535**, 221-235.

Jemal, A, Siegel, R, Ward, E, Murray, T, Xu, J, Smigal, C & Thun, MJ. (2006). Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin*, **56**, 106-130.

Jones, MK, Tsugawa, K, Tarnawski, AS, Baatar, D. (2004). Dual actions of nitric oxide on angiogenesis: possible roles of PKC, ERK, and AP-1. *Biochem Biophys Res Commun*, **318** (2), 520-8.

Kanayama, S, Yamada, Y, Onogi, A, Shigetomi, H, Ueda, S, Tsuji, Y, Haruta, S, Kawaguchi, R, Yoshida, S, Sakata, M, Sado, T, Kitanaka, T, Oi H, Yagyu, T,

Kobayashi H. (2007). Bikunin suppresses expression of pro-inflammatory cytokines induced by lipopolysaccharide in neutrophils. *Journal of endotoxin research*, **13**, 369-76.

Karamysheva, AF. (2008). Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)*, **73**, 751-762.

Kataoka, H, Itoh, H & Koono, M. (2002). Emerging multifunctional aspects of cellular serine proteinase inhibitors in tumor progression and tissue regeneration. *Pathol Int*, **52**, 89-102.

Kempen, LC, Leenders, WP. (2006). Tumours can adapt to anti-angiogenic therapy depending on the stromal context: lessons from endothelial cell biology. *European journal of cell biology*, **85**(2), 61-8.

Kesisis, G, Broxterman, H & Giaccone, G. (2007). Angiogenesis inhibitors. Drug selectivity and target specificity. *Curr Pharm Des*, **13**, 2795-2809.

Kessenbrock, K, Plaks, V, Werb, Z. (2010). Matrix Metalloproteinases: Regulators of tumor microenvironment. *Cell Journal*, **10**. 1016.

Kobayashi, H, Suzuki, M, Tanaka, Y, Hirashima, Y & Terao, T. (2001). Suppression of urokinase expression and invasiveness by urinary trypsin inhibitor is mediated through inhibition of protein kinase C- and MEK/ERK/c-Jun-dependent signaling pathways. *J Biol Chem*, **276**, 2015-2022.

Kobayashi, H, Suzuki, M, Tanaka, Y, Kanayama, N, Terao, T. (2003). AKunitz-type Protease Inhibitor, Bikunin, Inhibits Ovarian Cancer Cell Invasion by Blocking the Calcium-dependent Transforming Growth Factor- α Signaling Cascade. *The Journal of Biological Chemistry*, **10**, 7790-99.

Kobayashi, H, Suzuki, M, Hirashima, Y & Terao, T. (2003a). The protease inhibitor bikunin, a novel anti-metastatic agent. *Biol Chem*, **384**, 749-754.

Kobayashi, H, Suzuki, M, Hirashima, Y & Terao, T. (2003b). The protease inhibitor bikunin, a novel anti-metastatic agent. *Biol Chem*, **384**, 749-754.

Koehl, GE, Gaumann, A, Geissler, EK. (2009). Intravital microscopy of tumor angiogenesis and regression in the dorsal skin fold chamber: mechanistic insights and preclinical testing of therapeutic strategies. *Clin Exp Metastasis*, **26** (4), 329-44.

Koh, DC, Armugam, A & Jeyaseelan, K. (2006). Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 3030-3041.

Kondraganti, S, Gondi, CS, Gujrati, M, McCutcheon, I, Dinh, DH, Rao, JS & Olivero, WC. (2006). Restoration of tissue factor pathway inhibitor inhibits invasion and tumor growth in vitro and in vivo in a malignant meningioma cell line. *Int J Oncol*, **29**, 25-32.

Konduri, SD, Tasiou, A, Chandrasekar, N & Rao, JS. (2001). Overexpression of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2), decreases the invasiveness of prostate cancer cells in vitro. *Int J Oncol*, **18**, 127-131.

Kraut, J. (1977). Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annu Rev Biochem*, **46**, 331-358.

Krowarsch, D, Cierpicki, T, Jelen, F & Otlewski, J. (2003). Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cell Mol Life Sci*, **60**, 2427-2444.

Kumar, P, Shen, Q, Pivetti, CD, Lee, ES, Wu, MH, Yuan, SY. (2010). Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert Rev Mol Med*. **19**, 1017-1112.

Lafreine, RM, Buckner, CA, Bewick, MA. (2007) Cell adhesion and cancer: is there a potential for therapeutic intervention? *Expert. Opin. Ther Targets*, **11**(6), 727-31.

Lamalice, L, Boeuf, LF, Huot, J. (2007). Endothelial Cell Migration During Angiogenesis. *Circ Res*, **100**, 782-794.

Lanzer, D, Santos, RA, Etelvino, GM, Xavier, CH, de Almeida, SJ, Mendes, EP, Machado, LT, Prezoto, BC, Dive, V & de Camargo, AC. (2007). Do the cardiovascular effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) I involve ACE-independent mechanisms? new insights from proline-rich peptides of Bothrops jararaca. *J Pharmacol Exp Ther*, **322**, 795-805.

Larkins, TL, Nowell, M, Singh, S, Sanford, GL. (2006). Inhibition of cyclooxygenase-2 decreases breast cancer cell motility, invasion and matrix metalloproteinase expression. *BMC Cancer*, **10**, 6-181.

Laskowski, MJ, Kato, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review of Biochemistry*. **49**, 593-626.

Leslie, JD, Ariza-McNaughton, L, Bermange, AL., McAdow, R, Johnson, SL, and Lewis, J. (2007). Endothelial signaling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis. *Development* **134**: 839–844.

Levine, MN. (2009). New antithrombotic drugs: potential for use in oncology. *J Clin Oncol*, **27**, 4912-4918.

Lia, NG, Shib, ZH, Tang, YP & Duan, JA. (2009). Selective matrix metalloproteinase inhibitors for cancer. *Curr Med Chem*, **16**, 3805-3827.

Lobov IB, Renard RA, Papadopoulos N, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. (2007). Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci*, **104**(9), 3219-24.

London, NR, Whitehead, KJ, Li, DY. (2009). Endogenous endothelial cell signaling systems maintain vascular stability. *Angiogenesis*, **12**, 149-158.

- Lwaleed, BA & Bass, PS. (2006). Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *J Pathol*, **208**, 327-339.
- Makrilia, N, Lappa, T, Xyla, V, Nikolaidis, I & Syrigos, K. (2009). The role of angiogenesis in solid tumours: an overview. *Eur J Intern Med*, **20**, 663-671.
- Mans, BJ & Ribeiro, JM. (2008a). A novel clade of cysteinyl leukotriene scavengers in soft ticks. *Insect Biochem Mol Biol*, **38**, 862-870.
- Mans, BJ & Ribeiro, JM. (2008b). Function, mechanism and evolution of the moubatin-clade of soft tick lipocalins. *Insect Biochem Mol Biol*, **38**, 841-852.
- Mantovani, A & Sica, A. (2010). Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Current Opinion in Immunology*. **22**, 231-237.
- Mato, M, Ookawara, S, Namiki, T. (1989). Studies on the vasculogenesis in rat cerebral cortex. *Anat Rec*, **224**(3), 355-64.
- Matsuzaki, H, Kobayashi, H, Yagyu, T, Wakahara, K, Kondo, T, Kurita, N, Sekino, H, Inagaki, K, Suzuki, M, Kanayama, N, Terao, T. (2004). Bikunin inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha induction in macrophages. *Clinical and Diagnostic Laboratory immunology*, **6**, 1140-7.
- Milkiewicz, M, Ispanovic, E, Doyle, JL, Haas, TL. (2006). Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *Int J Biochem Cell Biol*. **38** (3), 333-57.
- Millers, EK, Masci, PP, Lavin, MF, de, JJ & Guddat, LW. (2009). Crystallization and preliminary X-ray analysis of a Kunitz-type inhibitor, textilinin-1 from *Pseudonaja textilis textilis*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, **62**, 642-645.
- Nagata, K, Hirono, S, Ido, A, Kataoka, H, Moriuchi, A, Shimomura, T, Hori, T, Hayashi, K, Kono, M, Kitamura, N & Tsubouchi, H. (2001). Expression of hepatocyte growth factor activator and hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, **289**, 205-211.
- Nagy, JA, Benjamin, L, Zeng, H, Dvorak, AM, Dvorak, HF. (2008). Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis*, **11**, 109-119.
- Namba, T, Koike, H, Murakami, K, Aoki, M, Makino, H, Hashiya, N, Ogiwara, T, Kaneda, Y, Kohno, M, Morishita, R. (2010). Angiogenesis Induced by Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Through Vascular Endothelial Growth Factor Expression in a Rat Hindlimb Ischemia Model. *Circulation*, **108**, 2250-2257.
- Namkoong, S, Lee, SJ, Kim, CK, Kim, YM, Chung, HT, Lee, H, Han, JA, Ha, KS, Kwon, YG, Kim, YM. (2005). Prostaglandin E2 stimulates angiogenesis by activating

the nitric oxide/cGMP pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Exp Mol Med*, **37**, 588-600.

Neurath, H & Walsh, KA. (1976). Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 3825-3832.

Nicolson, GL, Dulski, K, Basson, C, Welch, DR. (1985). Preferential organ attachment and invasion in vitro by B16 melanoma cells selected for differing metastatic colonization and invasive properties. *Invasion Metastasis*, **153** (1), 125-30.

Nussenbaum, F & Herman, MI. (2010). Tumor Angiogenesis: Insights and Innovations. *Journal of Oncology*, **132**, 641-56.

Olsson, AK, Dimberg, A, Kreuger, J, Claesson-Welsh L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **7**(5), 359-71.

Otlewski, J, Jelen, F, Zakrzewska, M & Oleksy, A. (2005). The many faces of protease-protein inhibitor interaction. *EMBO J*, **24**, 1303-1310.

Papetti, M, Herman, IM. (2002). Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American journal of physiology. Cell physiology*, **282**(5), 947-70.

Parr, C & Jiang, WG. (2001). Expression of hepatocyte growth factor/scatter factor, its activator, inhibitors and the c-Met receptor in human cancer cells. *Int J Oncol*, **19**, 857-863.

Parr, C & Jiang, WG. (2006). Hepatocyte growth factor activation inhibitors (HAI-1 and HAI-2) regulate HGF-induced invasion of human breast cancer cells. *Int J Cancer*, **119**, 1176-1183.

Pavlov, KA, Shchegolev, AI, Dan, VN, Sapelkin, SV, Mishnev, OD. (2009). Mediator interactions in vasculogenesis and angiogenesis. *Angiol Sosud Khir*. **15**(2):31-5.

Peault, B, Rudnicki, M, Torrente, Y, Cossu, G, Tremblay JP, Partridge, T. (2007) Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther* **15**(5), 867-877.

Pepper, MS, Belin, D, Montesano, R, Orci, L, Vassalli, JD. (1990). Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. *J. Cell Biol*. **111**, 743-755.

Perales, J, Neves-Ferreira, AG, Valente, RH & Domont, GB. (2005). Natural inhibitors of snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Toxicon*, **45**, 1013-1020.

Ramjaun, AR, Hodivala-Dilke, K. (2009). The role of cell adhesion pathways in angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, **41**(3), 521-30.

- Rao, RM, Yang, L, Garcia-Cardena, G & Luscinskas, FW. (2007). Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ Res*, **101**, 234-247.
- Ribeiro, MS, Almeida, C, Calisto, MC, Friedrich, T, Mentele, R, Sturzebecher, J, Prior, FP, Pereira, BJP. (2008). Isolation, Cloning and Structural Characterisation of Boophilin, a Multifunctional Kunitz-Type Proteinase. *Plos One*, **2**, e1624.
- Rini, BI & Small, EJ. (2005). Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*, **23**, 1028-1043.
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, **386**, 671-674.
- Roberts, OL, Holmes, K, Muller, J, Cross, DA & Cross, MJ. (2009). ERK5 and the regulation of endothelial cell function. *Biochem Soc Trans*, **37**, 1254-1259.
- Roca, C & Adams, HR. (2010). Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes Dev*, **21**, 2511-2524.
- Rucavado, A, Escalante, T & Gutierrez, JM. (2004). Effect of the metalloproteinase inhibitor batimastat in the systemic toxicity induced by Bothrops asper snake venom: understanding the role of metalloproteinases in envenomation. *Toxicon*, **43**, 417-424.
- Ruhrberg, C, Gerhardt, H, Golding, M, Watson, R, Ioannidou, S, Fujisawa, H, Betsholtz, C, Shima, DT. (2002). Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev*, **16** (20), 2684-98.
- Sainson, ACR & Harris, LA. (2008). Regulation of angiogenesis by homotypic and heterotypic notch signalling in endothelial cells and pericytes: from basic research to potential therapies. *Angiogenesis*, **11**, 41-51.
- Salameh, MA, Robinson, JL, Navaneetham, D, Sinha, D, Madden, BJ, Walsh, PN & Radisky, ES. (2010). The amyloid precursor protein/protease nexin 2 Kunitz inhibitor domain is a highly specific substrate of mesotrypsin. *J Biol Chem*, **285**, 1939-1949.
- Sawhney, SR, Liu, W, Brattain, GM. (2008). A Novel Role of ERK5 in Integrin-Mediated Cell Adhesion and Motility in Cancer Cells Via Fak Signaling. *J Cell Physiology*, **219** (1) 152-61.
- Schmidt-Lucke, C, Rossig, L, Fichtlscherer, S, Vasa, M, Britten, M, Kamper, U, Dimmeler, S & Zeiher, AM. (2005). Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation*, **111**, 2981-2987.
- Senger, DR, Connolly, DT, Van de Water, L, Feder, J, Dvorak, HF. (1990). Purification and NH2-Terminal Amino Acid Sequence of Guinea Pig Tumor secreted Vascular Permeability Factor-1. *Cancer research*, **50**, 1774-1778.

Shakiba, Y, Mansouri, K & Mostafaie, A. (2007). Anti-angiogenic effect of soybean kunitz trypsin inhibitor on human umbilical vein endothelial cells. *Fitoterapia*, **78**, 587-589.

Shellenberger, TD, Mazumdar, A, Henderson, Y, Briggs, K, Wang, M, Chattopadhyay, C, Jayakumar, A, Frederick, M, Clayman, GL. (2005). Headpin: a serpin with endogenous and exogenous suppression of angiogenesis. *Cancer Res*, **65** (24),11501-9.

Shpacovitch, V, Feld, M, Hollenberg, MD, Luger, TA & Steinhoff, M. (2008). Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol*, **83**, 1309-1322.

Shutter, JR, Scully, S, Fan, W, Richards, WG, Kitajewski, J, Deblandre, GA, Kintner, CR & Stark, KL. (2000). Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev*, **14**, 1313-1318.

Siekmann, AF & Lawson, ND. (2007). Notch signalling and the regulation of angiogenesis. *Cell adhesion & migration*, **2**, 104-6.

Sierko, E, Wojtukiewicz, MZ, Kisiel, W. (2007). The role of tissue factor pathway inhibitor-2 in cancer biology. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **7**, 653-9.

Silva, CL, Tamura, EK, Macedo, SM, Cecon, E, Bueno-Alves, L, Farsky, SH, Ferreira, ZS & Markus, RP. (2007). Melatonin inhibits nitric oxide production by microvascular endothelial cells in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol*, **151**, 195-205.

Skrzydowska, E, Sulkowska, M, Koda, M, Sulkowski S. *World J Gastroenterology*, **11**, 1251-66.

Smith, RP, Higuchi, DA & Broze, GJ, Jr. (1990). Platelet coagulation factor XIa-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein. *Science*, **248**, 1126-1128.

Spiering, D, Schmolke, M, Ohnesorge, N, Schmidt, Goebeler, M, Wegener, J, Wixler, V, Ludwig, S. (2009). MEK5/ERK5 Signaling Modulates Endothelial Cell Migration and Focal Contact Turnover. *J Bio Chem*, **284** (37), 24792-80.

Stathakis, P, Lay, AJ, Fitzgerald, M, Schlieker, C, Matthias, LJ & Hogg, PJ. (1999). Angiostatin formation involves disulfide bond reduction and proteolysis in kringle 5 of plasmin. *J Biol Chem*, **274**, 8910-8916.

Staton, CA, Reed, MW & Brown, NJ. (2009). A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int J Exp Pathol*, **90**, 195-221.

Steinhoff, M, Buddenkotte, J, Shpacovitch, V, Rattenholl, Moormann C, Vergnolle, N, Luger, AT, Hollenberg, DM. (2005). Proteinase-Activated Receptors: Transducers of Proteinase-Mediated Signaling in Inflammation and Imunne response. *Endocrine Reviews*, **26** (1):1–43.

Suchting, S., Freitas, C., le Noble, F., Benedito, R., Breant, C., Duarte, A., and Eichmann, A. 2007. The Notch ligand Deltalike 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**: 3225–3230.

Szekanecz, Z, Koch, AE. (2005) Endothelial cells in inflammation and angiogenesis. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, **4**(3),319-23.

Tepper, OM, Galiano, RD, Capla, JM, Kalka, C, Gagne, PJ, Jacobowitz, GR, Levine, JP & Gurtner, GC. (2002). Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*, **106**, 2781-2786.

Torres-Collado, AX, Kisiel, W, Iruela-Arispe, ML & Rodriguez-Manzanique, JC. (2006). ADAMTS1 interacts with, cleaves, and modifies the extracellular location of the matrix inhibitor tissue factor pathway inhibitor-2. *J Biol Chem*, **281**, 17827-17837.

Traynelis, SF, Trejo J. (2007). Protease-activated receptor signaling: new roles and regulatory mechanisms. *Current opinion in hematology*, **14** (3)-230-235.

Tsopanoglou, NE & Maragoudakis, ME. (2007). Inhibition of angiogenesis by small-molecule antagonists of protease-activated receptor-1. *Semin Thromb Hemost*, **33**, 680-687.

Urbich, C, Reissner, A, Chavakis, E, Dernbach, E, Haendeler, J, Fleming, I, Zeiher, AM, Kaszkin, M, Dimmeler, S. (2002). Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the anti-angiogenic effects of endostatin. *FASEB J.* **16** (7), 706-8.

Van Nostrand, WE, Wagner, SL, Farrow, JS & Cunningham, DD. (1990). Immunopurification and protease inhibitory properties of protease nexin-2/amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem*, **265**, 9591-9594.

Veeravagu, A, Hsu, AR, Cai, W, Hou, LC, Tse, VC & Chen, X. (2007). Vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor inhibitors as anti-angiogenic agents in cancer therapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, **2**, 59-71.

Vergnolle, N. (2009). Protease-activated receptors as drug targets in inflammation and pain. *Pharmacol Ther*, **123**, 292-309.

Waisman, K, Chudzinski-Tavassi, AM, Carrijo-Carvalho, LC, Pacheco, MT & Farsky, SH. (2009). Lopap: a non-inflammatory and cytoprotective molecule in neutrophils and endothelial cells. *Toxicon*.

Wang, D, Dubois RN. (2005). Prostaglandins and cancer. *Gut*, **55**, 115-22.

Wang, L, Dudek, SM. (2009). Regulation of vascular permeability by sphingosine 1-phosphate. *Microvascular research*. **77**, 39-45.

Weber, C, Fraemohs, L & Dejana, E. (2007). The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol*, **7**, 467-477.

Welch, GH, Black, CW. (2010). Overdiagnosis in cancer. *J Natl Cancer Inst*, **102**, 605-613.

Williams, RL, Courtneidge, SA & Wagner, EF. (1988). Embryonic lethalties and endothelial tumors in chimeric mice expressing polyoma virus middle T oncogene. *Cell*, **52**, 121-131.

Wise, LM, Veikkola, T, Mercer, AA, Savory, LJ, Fleming, SB, Caesar, C, Vitali, A, Makinen, T, Alitalo, K & Stacker, SA. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3071-3076.

Woodward, JKL; Holen, I; Coleman RE; Buttle, DJ. The roles of proteolytic enzymes in the development of tumor-induced bone disease in breast and prostate cancer. *Bone*, **41**:912-27.

Yamazaki, Y & Morita, T. (2007). Snake venom components affecting blood coagulation and the vascular system: structural similarities and marked diversity. *Curr Pharm Des*, **13**, 2872-2886.

Ying, L, Hofseth, LJ. (2007). An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer. *Cancer Res*, **67** (4), 1407-10.

Yoysungnoen, P, Wirachwong, P, Changtam, C, Suksamrarn, A, Patumraj, S. (2008). Anti-cancer and anti-angiogenic effects of curcumin and tetrahydrocurcumin on implanted hepatocellular carcinoma in nude mice. *World J Gastroentero*, **14** (13), 2003-9.

Zhang, F, Tang, Z, Hou, X, Lennartsson, J, Li, Y, Koch, AW, Scotney, P, Lee, C, Arjunan, P, Dong, L, Kumar, A, Rissanen, TT, Wang, B, Nagai, N, Fons, P, Fariss, R, Zhang, Y, Wawrousek, E, Tansey, G, Raber, J, Fong, GH, Ding, H, Greenberg, DA, Becker, KG, Herbert, JM, Nash, A, Yla-Herttuala, S, Cao, Y, Watts, RJ & Li, X. (2009). VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 6152-6157.

Ziche, M, Morbidelli, L. (2004). Nitric Oxide and Angiogenesis. *Journal of Neuro-oncology*, **50**, 139-148.