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

**Investigação dos mecanismos de ação do Amblyomin-X sobre a
angiogênese *in vivo* induzida pelo VEGF**

Carine Cristiane Drewes

**Dissertação para obtenção do
grau de MESTRE**

**Orientador (a): Profa. Dra.
Sandra Helena Poliselli Farsky**

**São Paulo
2011**

Carine Cristiane Drewes

**Investigação dos mecanismos de ação do Amblyomin-X sobre a
angiogênese *in vivo* induzida pelo VEGF**

**Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre**

**Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky
Orientadora/Presidente**

**Dra. Simone Michaela Simons
1º. Examinador**

**Dra. Martina Rudnicki
2º. Examinador**

São Paulo, 05 de Abril de 2011.

Aos meus pais,
Valdi Drewes e Olivedi Herpich Drewes,
pelo apoio, incentivo e amor incondicionais.

A minha irmã,
Lucieli Andréia Drewes,
pelo carinho, amizade e compreensão.

**Ao meu namorado,
Leonardo Ferraro Nascimento,
pelo amor, apoio, paciência e companheirismo.**

AGRADECIMENTOS

Não seria possível realizar esta Dissertação, da maneira que foi, sem o auxílio de muitos...

Aos meus pais, Valdi Drewes e Olivedi Herpich Drewes e a minha irmã, Lucieli Andréia Drewes, pelo exemplo de luta e boa conduta. Pelo amor incondicional que sempre foi demonstrado, apesar da distância. Obrigada pelo apoio, em todas as minhas decisões.....mesmo naquelas que, sabido seria fundamental para a continuidade dos meus estudos, mas que me afastaria fisicamente de vocês! Estou em São Paulo, mas parte do meu coração está no RS!

A minha querida orientadora, Sandra Helena Poliselli Farsky, pelo exemplo de dedicação, competência e amor à ciência. Sou muito grata pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho em seu laboratório, pelo carinho, paciência, compreensão, conselhos, discussões.... Obrigada pelo auxílio em meu crescimento profissional e pessoal, fundamentais para alcançar esta conquista.....Aliás, ela é nossa!!!

Ao meu namorado, Leonardo Ferraro Nascimento, pela paciência, amor, carinho e compreensão. Pelo companheirismo e tranquilidade que, acreditem, sempre me acompanharam.... nas horas em frente ao computador, estudando...escrevendo...ou indo sempre comigo para a USP nos finais de semana....para “cuidar das células” ou fotografar os animais.... pelas discussões científicas.....O seu apoio foi muito importante ao longo deste trabalho, e ele, em parte, também é seu!

Aos amigos Isabel Machado e José Roberto Santin, pela amizade, carinho, paciência e auxílio..... A Isa e o Zeca chegaram à pouco tempo no laboratório e em minha vida...mas, estes catarinenses foram fundamentais em uma etapa importante, onde eu decidiria a minha continuidade na vida acadêmica.....Obrigada, do fundo do coração!!

As pós-doutorandas Cristina Hebeda Duarte e Simone Bolonheis, pelos ensinamentos e auxílios sempre disponibilizados.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Toxicologia Experimental: André Nakasato, André Ribeiro, André Shimoyama, Ana Lúcia Shimada, Camila Araújo, Camila Lima, Gabriela Müller, Lara Lombardi, Rodrigo Dias,

Tiago Oliveira e Thaísa Sandini. Vocês, de uma ou de outra forma, contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

As minhas amigas do RS, Cristiane Portes Ribeiro, Vanessa Domingues e Alessandra Hübner de Souza pelo apoio, carinho e amizade.

A professora Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, e todos os seu alunos, pela disponibilização do seu laboratório de pesquisa sempre que necessário.

A professora Dra. Chao Yun Irene Yan, do Instituto de Ciências Biológicas da USP, pelo auxílio nos ensaios de angiogênese em membrana corioalantóica.

Aos professores do Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas, Ana Paula Moureiro, Elisabeth Nascimento, Ernani Pinto, Maurício Yonamine, Regina Lúcia Moreau e Tânia Marcourakis pela contribuição científica.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas, Ângelo, Dalva, Helena, Luzia e Nancy.

A Universidade de São Paulo e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de fazer parte deste programa de pós-graduação.

A FAPESP e a CAPES pelo apoio e suporte financeiro em todos os momentos em que se fizeram necessários.

MUITO OBRIGADA A TODOS!!!

RESUMO

Amblyomin-X é um inibidor de serinoprotease do tipo kunitz obtido de uma biblioteca de cDNA das glândulas salivares do carrapato *Amblyomma cajannense*. Dados preliminares mostraram que a injeção *in vivo* de Amblyomin-X reduziu a formação de massa tumoral induzida por células de melanoma B16F10 em camundongos. Com base neste dado e na ação de inibidores de serinoproteases sobre a angiogênese, este projeto foi delineado para caracterizar as ações do Amblyomin-X sobre a angiogênese *in vivo* e sobre funções da célula endotelial *in vitro* na vigência do fator de crescimento VEGF-A. Os efeitos do Amblyomin-X sobre a cinética de formação de novos vasos na rede microcirculatória *in vivo* foram investigados no modelo de câmara dorsal em camundongos e na membrana corioalantóica. Empregando cultura de células endoteliais de linhagem de microcirculação (t-End), foram avaliados os efeitos do Amblyomin-X sobre viabilidade e citoproteção celular (anexina e iodeto de propídio - PI), proliferação celular (incorporação do fluoróforo diacetato de carboxi-fluoresceína succinimidil éster) e ciclo celular, além da expressão das moléculas de adesão PECAM-1, ICAM-1, VCAM-1, β_1 e β_3 integrinas em ensaios de citometria de fluxo. A aderência celular em Matrigel foi quantificada por espectrofotometria, a formação de tubos foi mensurada por microscopia óptica e a expressão gênica das moléculas de adesão PECAM-1, ICAM-1 e VCAM-1 por RT-PCR. Os dados obtidos mostraram que a aplicação tópica do Amblyomin-X (100ng/10 μ L) reduziu a formação de novos vasos no tecido subcutâneo dorsal de camundongos, quando o tratamento foi iniciado anterior ou concomitantemente, mas não posteriormente ao tratamento ao VEGF (10ng/10 μ L) e, reduziu a formação de novos vasos na membrana corioalantóica, quando administrado concomitantemente com o VEGF (0,25ng/10 μ L). O Amblyomin-X não alterou a viabilidade de células t-End (1000ng/mL, 72 horas); inibiu a apoptose e apoptose tardia causada por meio de cultura carenciado (100ng/mL); inibiu a proliferação (10, 100 ou 1000ng/mL de Amblyomin-X, 48 e 72 horas); induziu parada nas fases G1/G0 do ciclo celular; diminuiu a aderência e a formação de tubos das células endoteliais; não alterou a expressão basal de PECAM-1, VCAM-1, ICAM-1, β_1 e β_3 integrinas, mas reduziu a expressão de PECAM-1, VCAM-1, ICAM-1 induzida

pelo VEGF-A. A redução da expressão protéica da PECAM-1 e ICAM-1 parece não ser dependente de ação do Amblyomin-X na expressão gênica, já que os níveis de RNAm não foram afetados pela ação do Amblyomin-X. Em conjunto, os dados obtidos neste trabalho mostram que o Amblyomin-X inibe a formação de novos vasos *in vivo*, por interferir, possivelmente, em mecanismos relacionados a sinalização da célula endotelial induzida pelo VEGF-A, em especial com a proliferação, adesão, tubulogênese e expressão de moléculas de adesão da família das imunoglobulinas.

Palavras-chave: Amblyomin-X. VEGF. Inibidores de serinoproteases do tipo kunitz. Angiogênese. Célula endotelial. Câmara dosal.

ABSTRACT

Investigation of mechanisms of action of Amblyomin-X on *in vivo* on VEGF-induced angiogenesis.

Amblyomin-X is a type-kunitz serineprotease inhibitor obtained from a cDNA library of the *Amblyomma cajannense* salivary glands. Preliminary data showed that *in vivo* injection of the protein reduced the formation of tumor-induced B16F10 melanoma cells in mice. Based on this data and on actions of serineproteases inhibitors on angiogenesis, this project aimed to characterize the actions of Amblyomin-X on angiogenesis *in vivo* and on *in vitro* endothelial cells functions in the presence of the growth factor VEGF. The effects of Amblyomin-X on the *in vivo* formation of microcirculatory new vessels were investigated in the dorsal chamber model in mice and in the chorioallantoic membrane assay. Mice microvascular endothelial cell lineage (t-End) was employed to evaluate the effects of Amblyomin-X on cytoprotection and cell viability (Annexin-V and propidium iodide-PI), cell proliferation (incorporation of the fluorophore fluorescein diacetate carboxy-succinimidil ester), cell cycle, membrane expression of PECAM-1, ICAM-1, VCAM-1, β_1 and β_3 integrins adhesion molecules using flow cytometry. Cell adhesion was assessed in matrigel by spectrophotometry, the formation of tubes was measured by optical microscopy and adhesion molecules PECAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression was evaluated by RT-PCR. Data obtained showed that topical application of Amblyomin-X (100ng/10 μ L) reduced the formation of new vessels, only when Amblyomin-X treatment started before or simultaneously to VEGF-A stimulation (10ng/10 μ L). Amblyomin-X (100ng/10 μ L) also reduced the formation of new vessels in the chorioallantoic membrane assay, when co-administered with VEGF (0.25ng/10 μ L). The Amblyomin-X did not alter the viability of t-End (1000ng/mL, 72 hours), inhibited apoptosis and late apoptosis caused by deprived serum (100ng/mL), inhibited proliferation (10, 100 or 1000ng/mL, 48 and 72 hours), induced G1/G0 arrest in cell cycle phases, decreased the cell adhesion and tube formation (100ng/mL), did not alter the basal expression of PECAM-1, VCAM-1, ICAM-1, β_1 or β_3 integrin, but reduced the PECAM-1, VCAM-1, ICAM-1 induced by VEGF-A. Impaired PECAM-1 and

ICAM-1 expression seems not be dependent on gene expression, as, mRNA levels were not affected by the action of Amblyomin-X. Together, the data obtained shows that the Amblyomin-X inhibits new vessel formation *in vivo*, by interfering, possibly, with mechanisms related to VEGF-A induced endothelial cell signaling, especially with the proliferation, adhesion, tubulogenesis and expression of adhesion molecules.

Key-words: Amblyomin-X. VEGF. Serineprotease Kunitz-type inhibitor. Angiogenesis. Endothelial cell. Dorsal Chamber.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Akt/PKB	Proteína quinase B
Ambly	Amblyomin-X
APP	Proteína precursora amilóide
CAM	Membrana Corioalantóica
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CDK	Quinase Dependente de Ciclina
CFSE	Carboxi-fluoresceína succinimidil éster
CO ₂	Gás carbônico
COX-2	Ciclooxigenase-2
DII	<i>Delta like ligand</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidermal
E-selectina	Selectina endotelial
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FAK	Quinases de adesão focal
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
ICAM-1	Moléculas de adesão intercelular-1
IL-8	Interleucina-8
JAM	Molécula de adesão juncional
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LPA	Ácido Lisofosfatídico
MAC-1	Antígeno de macrófago-1
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
ERK	Quinase reguladora de sinal extracelular
MMP	Metaloprotease
N-caderinas	Caderina neuronal
NO	Óxido nítrico
Nrp	Neuropilina
PARs	Receptores ativados por proteases
PBS	Tampão salina fosfato
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PE	Ficoeritrina
PECAM-1	Molécula de adesão de células endoteliais e plaquetas-1
PI	Iodeto de propídio
PI3K	Fosfatidilinositol 3'-quinase
PKC	Proteína quinase C
PLC γ	Fosfolipase C γ
PMA	Acetato de forbol miristato
PS	Fosfatidilserina
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
RT-PCR	Trascriptase reversa – reação de polimerização em cadeia
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro

SFB	Soro fetal bovino
SFKs	Src quinases
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteases
TNF α	Fator de necrose tumoral α
UBC	Ubiquitinina C
uPA	Ativador de plasminogênio do tipo uroquinase
VCAM-1	Moléculas de adesão celular vascular-1
VE-caderina	Caderina endotelial vascular
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular
VLA-4	<i>Very Late Antigen-4</i>
VPF	Fator de permeabilidade vascular
HUVEC	Célula endotelial de veia umbilical humana
CDK	Quinase dependente de ciclina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
NF- κ B	Fator nuclear <i>kappa</i> -B

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Mecanismo de formação de novos vasos	30
Figura 2 Interação dos fatores de crescimento da família do VEGF com seus receptores específicos	34
Figura 3 Vias de sinalização intracelular envolvidas na ativação do receptor de VEGF	36
Figura 4 Imagens sequenciais do procedimento do implante da câmara dorsal em camundongos Swiss	47
Figura 5 Imagem representativa de uma foto da microcirculação dorsal de camundongo e da malha digital utilizada para a quantificação dos vasos	51
Figura 6 Imagens sequenciais do procedimento do implante dos discos de celulose na membrana corioalantóica (CAM) de embriões de galinha.....	52
Figura 7 Índice do número de vasos da microcirculação subcutânea dorsal de camundongos após tratamento tópico com PBS ou VEGF, a cada 48 horas ..	61
Figura 8 Imagens representativas dos efeitos do VEGF (10ng/10µL), aplicado topicamente, sobre a rede microcirculatória dorsal de camundongos Swiss ...	62
Figura 9 Efeito do tratamento prévio/simultâneo com Amblyomin-X sobre a angiogênese induzida pelo VEGF no tecido subcutâneo dorsal de camundongos.....	63
Figura 10 Imagens representativas dos efeitos do Amblyomin-X (tratamento prévio/simultâneo) sobre a formação de novos vasos induzidos pelo VEGF no tecido subcutâneo dorsal de camundongos	64
Figura 11 Efeito do tratamento simultâneo com Amblyomin-X e VEGF sobre a angiogênese no tecido subcutâneo dorsal de camundongos.....	65

Figura 12 Imagens representativas dos efeitos do Amblyomin-X (tratamento simultâneo) sobre a angiogênese induzida pelo VEGF no tecido subcutâneo dorsal de camundongos	66
Figura 13 Efeito do tratamento posterior/simultâneo com Amblyomin-X sobre a formação de novos vasos induzidos pelo VEGF no tecido subcutâneo dorsal de camundongos.....	67
Figura 14 Imagens representativas dos efeitos do Amblyomin-X (tratamento posterior/simultâneo) sobre a formação de novos vasos induzidos pelo VEGF no tecido subcutâneo dorsal de camundongos	68
Figura 15 Efeito do Amblyomin-X sobre a angiogênese induzida pelo VEGF em membrana corioalantóica de embriões de galinha	69
Figura 16 Imagens representativas dos efeitos do Amblyomin-X (tratamento simultâneo) sobre a angiogênese induzida pelo VEGF em membrana corioalantóica de embriões de galinha	70
Figura 17 Efeitos do Amblyomin-X sobre a viabilidade de células endoteliais .	71
Figura 18 Efeitos do tratamento com Amblyomin-X sobre a morte de células endoteliais induzida por meio de cultura carenciado.....	72
Figura 19 Caracterização do modelo de proliferação de células t-End	74
Figura 20 Efeitos do Amblyomin-X sobre a proliferação de células endoteliais	74
Figura 21 Efeito do Amblyomin-X sobre a proliferação de células endoteliais induzida pelo VEGF	75
Figura 22 Efeitos do Amblyomin-X sobre o ciclo celular de células endoteliais	77
Figura 23 Efeitos do tratamento com Amblyomin-X sobre a aderência de células t-End em Matrigel®	79
Figura 24 Efeitos do Amblyomin-X sobre a formação de tubos de células endoteliais em Matrigel®.....	80

Figura 25 Imagens representativas dos efeitos do Amblyomin-X sobre a formação de tubos de células endoteliais em Matrigel®	81
Figura 26 Efeitos do Amblyomin-X sobre a expressão de moléculas de adesão, da superfamília das imunoglobulinas em células endoteliais	83
Figura 27 Efeitos do Amblyomin-X sobre a expressão de moléculas de adesão, da família das integrinas em células endoteliais	84
Figura 28 Efeito do tratamento com Amblyomin-X sobre a expressão gênica da PECAM-1 induzida pelo VEGF em células endoteliais	86
Figura 29 Efeito do tratamento com Amblyomin-X sobre a expressão gênica da VCAM-1 induzida pelo VEGF em células endoteliais	87
Figura 30 Efeito do tratamento com Amblyomin-X sobre a expressão gênica da ICAM-1 induzida pelo VEGF em células endoteliais	88

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Protocolo de padronização da concentração de VEGF utilizada na microcirculação dorsal de camundongos	48
Tabela 2 Protocolo de tratamento prévio/simultâneo na microcirculação dorsal de camundongos.....	48
Tabela 3 Protocolo de tratamento simultâneo na microcirculação dorsal de camundongos.....	49
Tabela 4 Protocolo de tratamento posterior/simultâneo na microcirculação dorsal de camundongos	50
Tabela 5 Protocolo de tratamento simultâneo do Amblyomin-X com o VEGF na CAM	53
Tabela 6 Característica dos ciclos de amplificação das reações de RT-PCR .	58
Tabela 7 Efeitos do Amblyomin-X sobre o ciclo celular de células endoteliais	78

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	10
ÍNDICE DE FIGURAS.....	12
ÍNDICE DE TABELAS.....	15
 1. INTRODUÇÃO	 18
1.1 Venenos Animais	18
1.2 Proteases	18
1.2.1 Inibidores de Proteases	21
1.3 Amblyomin-X.....	24
1.4 Angiogênese	26
1.4.1 Papel do VEGF na angiogênese	32
1.4.2 Papel das moléculas de adesão na angiogênese.....	36
2. OBJETIVOS	44
3. MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 Animais	45
3.2 Obtenção do Amblyomin-X	45
3.3 Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF).....	45
3.4 Células endoteliais da linhagem t-End	46
3.5 Angiogênese <i>in vivo</i> : modelo da câmara dorsal.....	46
3.5.1 Implante da Câmara Dorsal	46
3.5.2 Delineamento Experimental.....	47
3.5.3 Aquisição e análise das imagens.....	50
3.6 Angiogênese <i>in vivo</i> : modelo da membrana corioalantóica (CAM) de embriões de galinha.....	51
3.6.1 Preparação do ovo.....	51
3.6.2 Delineamento Experimental.....	53
3.6.3 Aquisição e análise das imagens.....	53
3.7 Ensaios de citometria de fluxo	53
3.7.1 Viabilidade Celular	54
3.7.2 Ensaio de Citoproteção.....	54
3.7.3 Proliferação Celular	55
3.7.4 Ciclo Celular	55

3.7.5 Avaliação da expressão de moléculas de adesão	56
3.8 Avaliação da aderência celular	56
3.9 Avaliação da formação de tubos	57
3.10 Determinação da expressão gênica das moléculas de adesão PECAM-1, VCAM-1 e ICAM-1 em células endoteliais	57
3.11 Análise Estatística	59
4. RESULTADOS	60
4.1 Angiogênese <i>in vivo</i> : modelo da câmara dorsal	60
4.1.1 Padronização da concentração de VEGF	60
4.1.2 Efeito do Amblyomin-X sobre a angiogênese induzida pelo VEGF ..	62
4.1.2.1 Efeitos do tratamento prévio/simultâneo do Amblyomin-X com VEGF	62
4.1.2.2 Efeitos do tratamento simultâneo do Amblyomin-X com VEGF	62
4.1.2.3 Efeitos do tratamento posterior/simultâneo do Amblyomin-X com VEGF	67
4.2 Angiogênese <i>in vivo</i> : membrana corioalantóica de ovos	68
4.2.1 Efeito do Amblyomin-X sobre a angiogênese em membrana corioalantóica de ovos	68
4.3 Investigações dos mecanismos de ação do Amblyomin-X <i>in vitro</i>	70
4.3.1 Efeito do tratamento com Amblyomin-X sobre a viabilidade de células endoteliais t-End	70
4.3.2 Efeito do Amblyomin-X sobre a morte induzida em células endoteliais	71
4.3.3 Efeito do Amblyomin-X sobre a proliferação da célula endotelial	73
4.3.4 Efeito do Amblyomin-X sobre o ciclo celular de células endoteliais t-End	76
4.3.5 Efeitos do Amblyomin-X sobre a aderência celular	79
4.3.6 Efeitos do Amblyomin-X sobre a formação de tubos	80
4.3.7 Efeitos do Amblyomin-X sobre a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais	82
4.3.8 Efeitos do Amblyomin-X sobre a expressão gênica da PECAM-1, VCAM-1 e ICAM-1 em células endoteliais	85
5. DISCUSSÃO	89
6. CONCLUSÕES	100
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
8. ANEXOS	119

1. INTRODUÇÃO

1.1 Venenos Animais

Os venenos animais possuem uma variedade de componentes, que incluem substâncias inorgânicas e orgânicas, e atuam no sentido de imobilizar a presa e digeri-la após a ingestão. Desta forma, estes componentes exercem seus efeitos em diferentes sistemas e tecidos da presa, como nos sistemas da coagulação, fibrinólise, calicreína-cininas, complemento, junção neuromuscular; nos tecidos cardiovascular, nervoso, renal, entre outros (FRY *et al.*, 2009; MATSUI *et al.*, 2000; ROWAN, 2001; SERRANO & MAROUN, 2005; YAMAZAKI & MORITA, 2007). Por estas habilidades, a compreensão dos mecanismos de ação dos venenos e suas toxinas, bem como a utilização destes como ferramentas científicas, têm contribuído efetivamente para o esclarecimento das bases fisiopatológicas dos envenenamentos e de diferentes doenças. Ademais, a caracterização das ações de toxinas isoladas tem permitido seus empregos como modelos para o desenho de novas moléculas com finalidade terapêutica (BROOK *et al.*, 2005; KOH *et al.*, 2006; LANZER *et al.*, 2007; MATSUI *et al.*, 2000; PERALES *et al.*, 2005; PÉREZ & SÁNCHEZ, 1999). Dentre os diversos animais estudados encontram-se os carrapatos. A saliva destes hematófagos apresenta diversos componentes, como por exemplo, os inibidores e ativadores de proteases. Estas enzimas ganham destaque, pois têm sido amplamente estudadas como interferentes da cascata da coagulação, agentes fibrinolíticos, inflamatórios e formadores de metástases (FRY *et al.*, 2009; MILLERS *et al.*, 2006; PERALES *et al.*, 2005; RUCAVADO *et al.*, 2004; YAMAZAKI & MORITA, 2007).

1.2 Proteases

Enzimas proteolíticas são abundantes e essenciais para a sobrevivência de todos os organismos, sendo codificadas por aproximadamente 1.200 genes, o que representa cerca de 4,5% do genoma humano (BERTINI *et al.*, 2009; SHPACOVITCH *et al.*, 2008). De acordo com seus mecanismos catalíticos, funções, 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 em <http://merops.sanger.ac.uk/>).

As enzimas proteolíticas são fundamentais para diversos processos biológicos que são essenciais para a vida, mas, também, podem ser prejudiciais caso não sejam controladas (CUDIC & FIELDS, 2009; LASKOWSKI JR & QUASIM, 2000). Para limitar a possível ação danosa das proteases ao organismo, caso haja desequilíbrio de expressão e/ou de sua ativação, ocorre regulação na expressão gênica, síntese protéica e atividade catalítica destas enzimas (DASLUEVA & MOSOLOV 1999; LASKOWSKI JR & QUASIM, 2000; LIA *et al.*, 2009).

As metaloproteases, as catepsinas e as serinoproteases possuem papel importante na gênese do câncer, com participação na evolução do tumor primário, bem como na disseminação e estabilização de metástases. De maneira geral, estas proteases estão envolvidas na modificação da relação estroma-tumor, levando à ativação ou inativação de várias citocinas e fatores de crescimento. Causam também a indução da expressão de moléculas de adesão, de maneira a favorecer a secreção e ação de fatores de crescimento e a migração celular, além da alteração da organização da matriz extravascular e da ativação de sistemas plasmáticos (BUTTLE, 2007).

A classe das serinoproteases compreende uma variedade de proteínas distribuídas em inúmeros tecidos e fluídos orgânicos, estas, estão envolvidas na regulação de uma diversidade de funções celulares para manutenção dos processos fisiológicos. Suas funções na digestão protéica, reprodução, regulação da pressão arterial, coagulação sanguínea, ativação do sistema complemento, do sistema calicreína–cininas e fibrinólise estão muito bem descritas (CUCCIOLONI *et al.*, 2009; NEURATH & WALSH, 1976). Está, ainda, bem estabelecido que células endoteliais e tumorais secretam serinoproteases que promovem a angiogênese, crescimento tumoral e metástases (SHARMA & SHARMA, 2007).

As serinoproteases são proteínas globulares, sintetizadas como zimogênios de cadeia única. Elas possuem uma arquitetura comum, com 2 domínios de 6 cadeias em β -barril, contendo o sítio catalítico. Essencialmente, estas proteínas compreendem um sítio de ativação zimógeno, uma região de reconhecimento do substrato e um centro catalítico. Este último possui um aminoácido serina, uma histidina e um ácido aspártico, denominado de tríade catalítica, característica, destas proteínas (KRAUT, 1977). A tripsina é considerada o protótipo da família, já que as demais serinoproteases possuem em média 50% de similaridade com a mesma (HEDSTROM, 2002).

Vários mecanismos têm sido propostos para ativação celular pelas proteases. Tem sido sugerido que ações fisiológicas ou patológicas importantes das serinoproteases são mediadas pela ativação dos receptores ativados por proteases (PARs), caracterizados na década de 90. A identificação destes receptores foi um passo importante para a definição das serinoproteases, não só como enzimas de degradação, mas como moléculas com papel na sinalização intracelular. Os PARs são receptores associados à proteína G, mas dependendo de sua natureza, diferentes quinases, como a proteína quinase C, tirosina quinase, entre outras, atuam como segundos mensageiros para a ativação dos PARs. As conseqüências da ativação dos PARs e os mecanismos de sinalização são distintos em cada tipo celular. Pelo menos três formas de ligação das serinoproteases ao receptor têm sido propostas: 1) As serinoproteases clivam a parte N-terminal do receptor para expor uma nova seqüência do domínio N-terminal, que permanece ligada ao receptor, compondo agora, uma segunda região extracelular do receptor responsável pela sinalização intracelular; 2) Alguns receptores possuem “seqüências de ativação de proteases”, acima ou abaixo do seu sítio de ativação, que permitem que as proteases fiquem perto do sítio de ativação, facilitando sua clivagem; 3) A seqüência ligada ao receptor após clivagem pelas proteases, pode ativar outros PARs adjacentes ligando-se ao seu segundo domínio extracelular. Ainda, algumas proteases podem clivar regiões mais internas ao sítio de ativação, clivando-o, e, desta forma, o receptor passa a não expressar mais o sítio de ativação, impedindo sua ativação proteolítica, num processo de inativação. Portanto, as proteases, por ação proteolítica, podem ativar ou inativar os PARs (VERGNOLLE, 2009).

Alguns peptídeos sintéticos, chamados PAR-APs podem ativar os PARs sem proteólise do receptor. Estes peptídeos têm sido alvos importantes de investigação na tentativa de elucidar outros mecanismos das serinoproteases, independente dos PARs (SHPACOVITCH *et al.*, 2008; VERGNOLLE, 2009). Como já salientado, as serinoproteases estão envolvidas na gênese de processos cancerosos, sendo relevantes para instalação do tumor primário, bem como para formação de metástases. O mecanismo proposto é amplo e complexo e está associado à sua ação proteolítica e a expressão de serinoproteases e de seus receptores PARs em células normais e cancerosas. Estas enzimas possuem um amplo espectro de ação no processo, que incluem a degradação da matriz extracelular, facilitando a adesão, migração, invasão e proliferação das células cancerosas; e a angiogênese. Estes efeitos são induzidos pela ação direta sobre as células envolvidas no processo, ou indiretamente, pela capacidade destas enzimas induzirem uma série de ações, em cascata, como a secreção de uma variedade de agentes pró-angiogênicos e citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, ou a ativação de sistemas plasmáticos, como a coagulação e o sistema complemento (AFFARA *et al.*, 2009). Desta forma, o controle endógeno da ação das serinoproteases é de grande relevância para a gênese do câncer e a descoberta de novos inibidores para o uso terapêutico é uma estratégia atraente para a área farmacêutica e da biotecnologia (GREENE & MCELVANEY, 2009; LEVINE, 2009).

Um equilíbrio crucial entre a expressão tecidual de serinoproteases e de outras moléculas, que atuam como seus inibidores, deve ocorrer. Assim, as investigações de novas moléculas capazes de inibir as serinoproteases se baseiam nos processos endógenos para tal fim.

1.2.1 Inibidores de Proteases

Os inibidores de proteases são usualmente específicos para uma das seis classes mecanicistas de proteases (FUJINAGA *et al.*, 2004). Pela ampla ação das proteases no organismo, as ações dos inibidores são relevantes em diferentes processos fisiológicos e patológicos, como coagulação, fibrinólise, câncer, metástases, angiogênese, distúrbios hemorrágicos, inflamação,

pressão arterial, entre outros (BARR *et al.*, 2007; CRAVEDI *et al.*, 2007; MANNELLO, 2006; MOLINA & HILL, 2007; SHAH & DINAPOLI, 2007).

Os inibidores de serinoproteases são específicos para a diversidade de serinoproteases expressas no organismo (HWANG *et al.*, 2009) e compreendem uma grande família de proteínas, que de acordo com sua forma de interação com as serinoproteases, são classificadas como: 1) inibidores canônicos, que interagem fracamente à enzima, de maneira não covalente, e bloqueiam diretamente o sítio ativo, sem alterações conformacionais; 2) inibidores não canônicos, que realizam ligações fortes e específicas, inibindo o sítio ativo da enzima pela ligação ao N-terminal do inibidor; 3) inibidores da sub-família das serpinas, do inglês *Serpin* (*serin protease inhibitor*), que formam um complexo covalente acil-enzima, provocam uma forte alteração conformacional no inibidor quebrando o sítio ativo da protease (KROWARSCH *et al.*, 2003; OTLEWSKI *et al.*, 2005).

Devido à diversidade de serinoproteases envolvidas na carcinogênese, a literatura é bastante ampla quanto aos efeitos de diferentes inibidores de serinoproteases, os quais apresentam mecanismos de interação distintos. Apesar das ações anti-tumorais dos inibidores de serinoproteases serem bem relatadas, alguns destes inibidores, inexplicavelmente, agravam a progressão da doença (KATAOKA *et al.*, 2002). Desta forma, a literatura que cerca o assunto é muito ampla e complexa. Como o foco do presente 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.

Os inibidores de protease do tipo Kunitz são formados por domínios 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. O domínio do tipo kunitz é caracterizado por 6 resíduos de cisteína bem conservados, formando três pontes de dissulfetos. Estes podem ser encontrados em proteínas homogêneas, que possuem múltiplos domínios repetidos de módulos kunitz, ou em proteínas heterogêneas, em combinação com módulos estruturais não relacionados (CORRAL-RODRIGUEZ *et al.*, 2009).

Apesar da maioria dos inibidores de serinoproteases serem proteínas secretadas, a classe das enzimas com um ou dois domínios tipo kunitz são glicoproteínas transmembrana, com o domínio extracelular próximo à região carboxi-terminal e um domínio citoplasmático pequeno. No geral, as interações entre as enzimas e o domínio tipo kunitz são reversíveis. Apesar das funções biológicas destes inibidores ainda não estarem completamente esclarecidos, eles devem apresentar funções importantes na proteólise da superfície celular além de estarem envolvidos em interações intermoleculares na superfície celular, independente, possivelmente, do seu domínio catalítico (KATAOKA *et al.*, 2002).

O papel catalítico do domínio kunitz tem sido bem mostrado na cascata da coagulação. Exemplificando a importância deste domínio, tem sido proposto que o inibidor endógeno da cascata da coagulação (*tissue factor pathway inhibitor* - TFPI), que é essencialmente composto por três seqüências Kunitz, bloqueia o passo inicial da coagulação por ligar-se ao N-terminal do fator tissular ligado ao fator VIIa. No entanto, esta ligação é precedida da interação do domínio central Kunitz com o Fator Xa (CORRAL-RODRIGUEZ *et al.*, 200; LWALEED & BASS, 2006). Adicionalmente, o TFPI-2, via seu domínio kunitz, inibe uma série de serinoproteases com papel na digestão e remodelação da matriz extracelular. Assim, a síntese reduzida de TFPI-2 está relacionada a uma série de processos fisiopatológicos como inflamação, angiogênese, aterosclerose e crescimento de metástases (CHAND *et al.*, 2005).

O precursor da proteína amilóide (APP) é uma proteína transmembrana expressa por uma diversidade de células no organismo, com 57 aminoácidos com alta homologia para o domínio kunitz, presentes nos inibidores de serinoproteases. A APP madura normalmente possui seu ectodomínio clivado por proteinases chamadas α -secretases e a forma expressa abundantemente após clivagem, que possui o domínio kunitz, é a chamada nexina II (PN-II). Tem sido mostrado que a APP/PN-II é um potente inibidor do Fator XIa da coagulação, tripsina, quimiotripsina, proteína ligada ao fator de crescimento epidermal, entre outros (SMITH *et al.*, 1990; VAN NOSTRAND *et al.*, 1990).

No processo de carcinogênese, a expressão e atividade de inibidores de serinoproteases do tipo kunitz pelas células normais e cancerígenas ainda precisa ser melhor compreendida. Os níveis plasmáticos e urinários destes

inibidores estão aumentados em pacientes com câncer. No entanto, o mecanismo exato desta maior expressão e de seus efeitos não são totalmente conhecidos (LWALEED & BASS, 2006).

Tem sido mostrado que a administração de um inibidor endógeno de serinoprotease do tipo Kuntiz, o Bikunin que é predominantemente encontrado no líquido amniótico humano, bloqueia a invasão tecidual pela célula cancerosa por uma ação direta na atividade da plasmina na membrana celular e pela inibição da expressão gênica e protéica do ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA) (KOBAYASHI *et al.*, 2003). Adicionalmente, a incubação de células de linhagem de câncer ovariano humano com Bikunin suprimiu a fosforilação de MAP quinases induzida pelo acetato de forbol miristato (PMA), com conseqüente redução da motilidade celular por meio da regulação negativa dos mecanismos dependentes de MEK/ERK/c-Jun (KOBAYASHI *et al.*, 2001; KOBAYASHI *et al.*, 2003).

A ação dos inibidores de serinoproteases na carcinogênese é muito mais ampla que a ação direta sobre as células tumorais, já que o inibidor de fator tissular alterou a expressão de genes relacionados à oncogênese, invasão, metástase, apoptose e angiogênese (CHAND *et al.*, 2004), além de regular a matriz extravascular por inibir diretamente serinoproteases e, indiretamente, por inativar metaloproteinases de matriz, já que algumas serinoproteases ativam as pró-formas das metaloproteinases (CHAND *et al.*, 2005).

As informações descritas acima, embora que não tenham abrangido toda a vasta literatura sobre o papel dos inibidores de serinoproteases tipo kunitz, mostram seu papel relevante na carcinogênese e conseqüentemente na angiogênese. Os mecanismos envolvidos são complexos justamente pela ampla magnitude de ação destes inibidores.

1.3 Amblyomin-X

Tem sido demonstrado que a glândula salivar de carrapatos secreta uma série de toxinas, entre as quais inibidores de serinoproteases, que afetam a cascata da coagulação, fibrinólise e agregação plaquetária (FRY *et al.*, 2009; FRANCISCHETTI *et al.*, 2005; GUEDES *et al.*, 2005; MANS *et al.*, 2008; MANS

& RIBEIRO, 2008). Estas toxinas anticoagulantes tornam o sangue do hospedeiro mais fluído, facilitando a alimentação.

Mais recentemente, o grupo de Chudzinski-Tavassi, do Instituto Butantan, vem estudando o carrapato *Amblyomma cajennense*. Esta espécie pertence à família *Ixodidae*, subfamília *Amblyomminae* e possui importância médica e veterinária no Brasil por ser parasita de cavalos, gado e cães. Além disso, este carrapato é o responsável pelo maior número de picadas em humanos e o principal vetor da febre maculosa, causada pela *Rickettsia rickettsii* (GUEDES *et al.*, 2005; HORTA *et al.*, 2004; MANS & RIBEIRO, 2008).

O mesmo grupo de pesquisa 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 biblioteca, foi estabelecido o perfil dos genes transcritos mais expressos pela glândula do carrapato. Dentre os transcritos encontrados nessa biblioteca, um deles apresentava homologia com inibidores do tipo Kunitz, com características que se assemelhavam a inibidores do Fator Xa, e por isso, este gene foi eleito para clonagem e expressão. Este gene foi expresso em *Escherichia coli* ou *Pichia pastoris* e o material recombinante obtido da *Pichia pastoris* foi denominado 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.*, 2009).

Estudos experimentais com a proteína recombinante têm mostrado sua capacidade de interferir com o sistema da coagulação, prolongando o tempo de coagulação (BATISTA *et al.*, 2009); 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, embora que preliminar, está baseada nas observações que camundongos tratados com o Amblyomin-X, por via intraperitoneal, apresentaram redução da massa tumoral no tecido subcutâneo dorsal induzida pela injeção de células de melanoma da linhagem B16F10 (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, poderão contribuir para a utilização desta proteína como ferramenta científica.

1.4 Angiogênese

A Organização Mundial da Saúde afirma que o câncer é uma das principais causas de mortalidade no mundo, sendo responsável por 7,9 milhões de mortes (cerca de 13% de todas as mortes) em 2007. Além disso, as estimativas indicam que as mortes por câncer, no mundo inteiro, continuarão crescendo, com um número estimado de 12 milhões de óbitos em 2030 (WHO, <http://www.who.int/cancer/en/>, acessado em 19.01.2010). Para corroborar estes dados, um estudo americano mostra que a doença é diagnosticada em meio milhão de pessoas nos Estados Unidos anualmente (JEMAL *et al.*, 2006).

No momento do diagnóstico, uma das características da doença avaliada é a presença de metástases. Apesar de sua reconhecida importância na evolução do processo patológico, os mecanismos moleculares da formação das metástases ainda não estão completamente estabelecidos. No entanto, sabe-se que tanto para inicialização e crescimento da massa tumoral primária, como para a formação das metástases, é necessário o crescimento de novos vasos sanguíneos no microambiente tumoral. Estes novos vasos são responsáveis pela perfeita irrigação sanguínea das células tumorais.

A formação de novos vasos é realizada por dois mecanismos, a saber: vasculogênese e angiogênese. A vasculogênese é a formação vascular a partir da diferenciação de precursores não diferenciados, responsável pela rede vascular durante as primeiras fases do desenvolvimento embrionário além de contribuir para a vascularização em alguns tipos de tecidos (KARAMYCHEVA, 2008). O papel da vasculogênese na fase adulta tem sido investigado, uma vez que células precursoras migram da medula óssea para a circulação. Números reduzidos destas células têm sido associados à disfunção endotelial, infarto cerebral e doença arterial coronária (HILL *et al.*, 2003; SCHMIDT-LUCKE *et al.*, 2005; TEPPER *et al.*, 2002), sugerindo seu papel na manutenção da hemostasia. A angiogênese é a formação de novos vasos a partir da rede vascular pré-existente e é fundamental para a embriogênese e

desenvolvimento; para o sucesso de cicatrizações, transplantes de tecidos e regeneração tecidual; na formação de massas tumorais e metástases de células neoplásicas; entre outros (BERGERS & BENJAMIN, 2003; KARAMYCHEVA, 2008).

Assim, a inibição da angiogênese tem sido alvo de estratégia terapêutica (COLE & JAYSON, 2008; KESISIS *et al.*, 2007). 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 (TSOPANOGLU & MARAGOUDAKIS, 2007). Por outro lado, a inibição da angiogênese tem sido uma estratégia terapêutica para o câncer, em especial os muito invasivos. Muitos estudos são encontrados na literatura e, algumas moléculas, desenvolvidas com este intuito estão em diferentes fases de testes pré-clínicos e clínicos (COLE & JAYSON, 2008; KESISIS *et al.*, 2007).

A angiogênese é fundamental, pois um nódulo tumoral em crescimento necessita do fornecimento de oxigênio e nutrientes, a fim de manter a sua atividade vital. É conhecido que sem o fornecimento contínuo de sangue, para a remoção de metabólitos e fornecimento de nutrientes, as dimensões de um nódulo tumoral não excedem 2-3mm³ devido à hipóxia, levando as células tumorais à morte (CRAWFORD *et al.*, 2009; KARAMYSHEVA, 2008). Por isso, para que ocorra evolução e ampliação do tamanho e da massa tumoral, a angiogênese deve ocorrer, pois a distância limite para a difusão do oxigênio do vaso é de 150 a 200 µm, para que a célula mantenha suas funções metabólicas e biológicas (FOLKMAN & HOCHBERG, 1973; KEMPEN & LEENDERS, 2006).

O processo da angiogênese é regulado pelo delicado equilíbrio entre uma série de fatores que possuem atividade regulatória positiva ou negativa, ou seja, pró-angiogênicos (como por exemplo VEGF, FGFs, PDGFB, EGF, LPA, TNFα, angiopoietinas, injúria, hipóxia e inflamação) ou anti-angiogênicos (trombospondinas, estatinas, tais como as angiostatinas e as endostatinas, pericitos e fragmentos de colágeno) (BERGERS & BENJAMIN, 2003). Assim, a indução da angiogênese depende de um desequilíbrio favorável dos fatores pró-angiogênicos (BERGERS & BENJAMIN, 2003; KARAMYCHEVA, 2008).

Durante a angiogênese, as células endoteliais adquirem características heterogêneas quanto à morfologia, função e expressão gênica, promovendo assim a liberação de enzimas para a degradação da matriz extravascular, extensa atividade secretora, alteração da mobilidade e da proliferação. 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, conhecidas como *tip cells*, que se ligam intimamente a células endoteliais que se dividem, denominadas *stalk cells*, e formam o novo lúmen vascular (GERHARDT *et al.*, 2003; RUHRBERG *et al.*, 2002). As *tip cells*, como já salientado, são as células inicializadoras da angiogênese e são caracterizadas pela sua localização na extremidade do espalhamento vascular. Estas respondem ao gradiente de concentração do VEGF, que especificamente direciona sua migração e altera suas propriedades adesivas, induz a secreção de componentes que degradam a matriz extravascular, além de induzir a emissão de protusões de filapódios para a formação de capilares (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 do fator de crescimento do endotélio vascular 2 (VEGFR-2), expresso em altas concentrações por estas células (LESLIE *et al.*, 2007; MATO *et al.*, 1989). 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 VEGFRs são importantes para ativar vias intracelulares que resultam na seleção das células endoteliais para a angiogênese, receptores *Notch* e seus ligantes (*delta like ligand* (Dll)) 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. 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 VEGFR2, principal mediador angiogênico durante o desenvolvimento vascular (ROCA & ADAMS *et al.*, 2010; SUCHTING *et al.*, 2007).

A angiogênese é um processo altamente dinâmico e complexo, caracterizado por uma seqüência coordenada de interações humorais e celulares (BERGERS & BENJAMIN, 2003; CARMELIET *et al.*, 1997; CARMELIET & JAIN, 2000; CARMELIET, 2000; RISAU, 1997), como descrito seqüencialmente abaixo (Figura 1):

(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 óxido nítrico (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 *tip 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 às 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 Mecanismo de formação de novos vasos. Adaptado de BERGERS & BENJAMIN, 2003.

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 músculo liso, lâmina basal e pericitos.

As células da musculatura lisa vascular 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).

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).

Os pericitos são derivados do tecido embrionário mesenquimal e são encontrados, principalmente, na membrana basal dos vasos sanguíneos, em especial em vênulas pós-capilares. 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 de células-tronco, que lhes permitem estar envolvidas na regeneração tecidual (PEAULT *et al.*, 2007; SAINSON & HARRIS, 2008). Já está descrito a interação dos pericitos com as células endoteliais adjacentes pela interação de moléculas de adesão celular denominados N-caderinas (DEJANA, 2004). Além disso, a interação das integrinas $\alpha_4\beta_1$, presentes nas células endoteliais, com a VCAM-1 presente nos pericitos, é crucial para a estabilização de novos vasos sanguíneos e recrutamento de pericitos para a neovasculatura (DESGROSELLIER & CHERESH, 2010).

Assim, sabendo-se que a angiogênese é um processo fundamental em muitas doenças, têm-se buscado terapias efetivas contra este processo altamente dinâmico e complexo. Além do câncer, algumas doenças como a psoríase, endometriose, degeneração macular, artrite reumatóide e aterosclerose (CRAWFORD & FERRARA, 2009; NUSSENBAUM & HERMAN, 2010) são, também, dependentes do processo da angiogênese. Por esta razão há um grande número de estudos encontrados na literatura a respeito do desenvolvimento de moléculas, com o intuito de inibir a angiogênese. Algumas destas moléculas estão em diferentes fases de testes pré-clínicos e clínicos (COLE & JAYSON, 2008; KESISIS *et al.*, 2007). Como por exemplo, podemos citar o Avastin® empregado no tratamento de câncer colo-retal, o Tarceva® na terapia de câncer de pulmão, o Lucentis® e o Macugen® para o tratamento da degeneração macular (CRAWFORD & FERRARA, 2009; FOLKMAN, 2006).

1.4.1 Papel do VEGF na angiogênese

SENGER e colaboradores, em 1983, por meio de estudos voltados para a identificação das propriedades fisiológicas de vasos celulares em tumores de cobaias, descreveram uma proteína que promovia a permeabilidade vascular na pele, com potência 50.000 vezes maior do que a da histamina. Esta proteína foi denominada “fator de permeabilidade vascular endotelial” (*vascular permeability factor* – VPF).

Em 1989, FERRARA & HENZER relataram o isolamento de um mitógeno celular-endotélio específico, oriundo de um meio que foi acondicionado por células foliculares pituitárias bovinas. Como esta proteína apresentou uma atividade promotora de crescimento somente na presença de células endoteliais vasculares, ela foi denominada VEGF (*vascular endothelial growth factor*). No mesmo ano, ambos os grupos, de SENGER e colaboradores e de FERRARA & HENZER descreveram a clonagem do cDNA do VEGF e VPF (KECK *et al.*, 1989; LEUNG *et al.*, 1989) e, a partir de então, concluíram que o VEGF e o VPF eram a mesma molécula. Assim, foi ressaltado que este fator era potente, difusível e específico para células endoteliais e que era responsável por regular o crescimento fisiológico e patológico de vasos sanguíneos (FERRARA, 1991; FERRARA 2009; FERRARA & HENZEL, 1989; LEUNG *et al.*; 1989).

O gene humano do VEGF está organizado em oito éxons e sete íntrons, estando localizado no cromossoma 6p21.3 (VICENTI *et al.*, 1996). A família do VEGF é composta de sete membros. Cada membro da família é uma glicoproteína dimérica secretada, sendo conhecidas como VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F e o fator de crescimento placentário (PlGF) (HOEBEN *et al.*, 2004).

O VEGF-A, comumente referenciado como VEGF, foi o primeiro a ser descoberto (DVORAK *et al.*, 2002; KARAMYCHEVA, 2008). O VEGF-A é uma glicoproteína homodimérica de 45 kDa envolvida em uma série de atividades angiogênicas (HICKLIN & ELLIS 2005; HOEBEN *et al.*, 2004). Variantes resultantes de modificação pós transcricional (*splicing*) alternativo do mRNA de um único gene, codificam inúmeras formas protéicas de VEGF com subunidades polipeptídicas contendo 121, 165, 189 e 206 aminoácidos em

humanos (HICKLIN & ELLIS 2005; RIBATTI, 2004). Além dessas, algumas isoformas menos comumente expressas têm sido identificadas, como é o caso do VEGF₁₄₅ e o VEGF₁₈₃ (HICKLIN & ELLIS 2005; NEUFELD *et al.*, 1999). Vale ressaltar que as isoformas presentes em camundongos possuem um aminoácido a menos que a forma correspondente à humana. Assim, o VEGF₁₆₅ presente em humanos é correspondente ao VEGF₁₆₄ de camundongos (OLSSON *et al.*, 2006).

A isoforma molecular predominantemente produzida pela maioria das células normais, bem como células alteradas, é o VEGF₁₆₅ (FERRARA, 1996, FERRARA, 1999). Os VEGF₁₂₁ e o VEGF₁₈₉ são detectados na maioria das células e tecidos normais que expressam o gene do VEGF.

Uma importante característica das isoformas do VEGF-A é a sua habilidade de ligar-se à heparina. As diferenças na capacidade de ligação determinam suas biodisponibilidades, podendo desempenhar diferentes papéis durante a angiogênese (RED-HORSE *et al.*, 2007). A ligação à heparina pode ser diferencial para o acúmulo de VEGF na matriz extracelular ou na secreção para a interação autócrina, parácrina ou exócrina. Enquanto o VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆ se ligam com alta afinidade à heparina, acumulando-se na matriz extracelular, o VEGF₁₂₁ não se liga facilmente à heparina e o VEGF₁₆₅ possui propriedades intermediárias (KARAMYSHEVA, 2008).

As isoformas que são seqüestradas na matriz extracelular, como é o caso do VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D, podem ser liberadas em uma forma difusível pela plasmina, seguida da clivagem na terminação –COOH, gerando um fragmento bioativo (HICKLIN & ELLIS 2005, HOFER & SCHWEIGHOFER, 2007; KARAMYSHEVA, 2008). Segundo HOEBEN e colaboradores (2004), a plasmina está envolvida na degradação da matriz extracelular, diretamente pela digestão dos componentes da membrana basal e indiretamente por ativação da collagenase através de zimógenos (pró-enzimas), resultando, assim, na liberação do VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₉ e VEGF-A₂₀₆. Desta forma, existem dois mecanismos possíveis para a disponibilidade do VEGF para as células endoteliais: pelo *splicing* alternativo, gerando proteínas difusíveis como o VEGF₁₆₅ e o VEGF₁₂₁, ou pela ativação de proteases e clivagem das isoformas mais longas (FERRARA, 2002).

Os fatores de crescimento da família do VEGF exercem os seus efeitos biológicos através da interação com receptores localizados nas membranas das células endoteliais. Três receptores se ligam a diferentes fatores de crescimento: VEGFR1 (FLT1 ou *fms-like tyrosine-kinase-1*), VEGFR2 (Flk1/KDR ou *fetal liver kinase-1/ kinase domain region*) e VEGFR3 (FLT4 ou *fms-like tyrosine-kinase-4*) (FERRARA *et al.*, 2003; HOEBEN *et al.*, 2004; KARAMYSHEVA, 2008; OLSSON *et al.*, 2006).

Estes receptores pertencem a super família dos receptores tirosina quinases. São proteínas transmembrana formadas pela região extracelular, constituída de sete domínios tipo imunoglobulinas (IG I- VII), enquanto a parte intracelular tem atividade de tirosina quinase, sendo este domínio separado em dois fragmentos (TK-1 e TK-2) por uma inserção inter-quinase (Figura 2) (OLSSON *et al.*, 2006). Dentre estes receptores, dois foram originalmente identificados na célula endotelial, o VEGFR-1 e VEGFR-2 (HICKLIN & ELLIS, 2005), sendo que o VEGFR-2 é o principal mediador das ações do VEGF na célula endotelial (GILLE *et al.*, 2001; WISE *et al.*, 1999).

Figura 2 Interação dos fatores de crescimento da família do VEGF com seus receptores específicos. Adaptado de OLSSON *et al.*, 2006.

A interação dos VEGFs com seus receptores ativam vias intracelulares que resultam no crescimento, proliferação, diferenciação além da manutenção da célula endotelial nos vasos recém formados (OLSSON *et al.*, 2006). Os mecanismos são complexos e alvos de intensa investigação, no sentido de se conhecer estas cascatas de sinalização e se estabelecer opções terapêuticas mais eficientes, no caso de patologias relacionadas ao VEGF (KARAMYSHEVA, 2008; VEERAVAGU *et al.*, 2007). O VEGF é um regulador chave na angiogênese, sendo um fator de sobrevivência para células endoteliais *in vivo* e *in vitro*, estimulando o crescimento de células endoteliais que originam artérias, veias e vasos linfáticos e prevenindo a apoptose destas células (HOFER & SCHWEIGHOFER, 2007; KARAMYSHEVA, 2008; OLSSON *et al.*, 2006).

Está bem estabelecido que a ativação dos receptores tirosina quinase em células endoteliais é tipicamente iniciada pela ligação da molécula ativadora (VEGF) no sítio específico do domínio extracelular do receptor. Esta ligação induz uma dimerização dos receptores, resultando na autofosforilação dos resíduos tirosina dentro do domínio citoplasmático, onde o primeiro substrato desta ligação do VEGF aos seus diferentes receptores inicia diferentes vias de sinalização intracelular. De uma maneira simplificada, esta autofosforilação de resíduos tirosina é que conduz à ativação da transdução de sinal de moléculas como fosfolipase C γ (PLC γ), fosfatidilinositol 3'-quinase (PI3K), proteína quinase B (Akt/PKB), Ras, tirosina-quinases coativadoras de receptores esteroidais (Src) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). A ativação de fosfolipase C γ leva a liberação de cálcio (Ca²⁺) e ativação da proteína quinase C (PKC). Essa, por sua vez, estimula as vias Raf/MAPK (Figura 3) (ELICEIRI *et al.*, 1999; OLSSON *et al.*, 2006; RINI & SMALL, 2005; ROBERTS *et al.*, 2009).

As células endoteliais, assim como algumas células tumorais, expressam também co-receptores para o VEGF (não tirosina quinase) a Neuropilina 1 e 2 (Nrp1 e Nrp2), os quais se ligam seletivamente a isoforma VEGFA₁₆₅. Ambos estão envolvidos em processos neuronais mas também assumem um importante papel no processo da angiogênese (HICKLIN & ELLIS, 2005; NEUFELD *et al.*, 1999).

Diante do exposto, fica evidente que o VEGF é um dos mais potentes agentes angiogênicos, mediando ações na célula endotelial em todas as etapas do processo. No entanto, as vias de sinalização intracelulares são complexas e ainda não estão totalmente estabelecidas. 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 está sendo empregado para esclarecer os mecanismos de ação do Amblyomin-X sobre a formação de novos vasos.

Figura 3 Vias de sinalização intracelular envolvidas na ativação do receptor de VEGF. Adaptado de OLSSON *et al.*, 2006.

1.4.2 Papel das moléculas de adesão na angiogênese

A parede vascular é constituída por uma monocamada de células endoteliais que revestem o lúmen dos vasos, e está em contato direto com o sangue circulante. A sua integridade funcional e estrutural é fundamental para a manutenção da homeostasia (NEREM *et al.*, 1993).

O endotélio participa ativa e dinamicamente no controle do tônus vascular, inflamação, resposta imune, angiogênese/arteriogênese e trombose/hemostase, uma vez que expressa uma série de moléculas vaso-reguladoras, diferentes classes de receptores de membrana, secreta substâncias químicas e expressa proteínas específicas de adesão (PREISSNER *et al.*, 2000). O descontrole das atividades endoteliais está envolvido, direta ou indiretamente, na gênese de diferentes doenças (DING & TRIGGLE, 2010; GOLDBERG *et al.*, 2010; LEE & SLUTSKY, 2010; SLEVIN & KRUPINSKI, 2009).

A formação de novos vasos requer a transição epitelial-mesenquimal das células endoteliais, que resultam em alterações acentuadas na sua morfologia, secreção e metabolismo como já salientado anteriormente (GHERSI, 2008). Um dos mecanismos importantes exercidos pela célula endotelial é a expressão de moléculas de adesão em suas membranas, que medeiam a adesão homotípica e/ou heterotípica. Estas moléculas, na maioria das vezes são receptores glicoprotéicos, constitutivamente expressos na membrana celular, ou estocados em grânulos intracelulares, ou ainda sintetizados frente à estimulação de diferentes origens, como substâncias químicas e à alterações hemodinâmicas. Na última década tem sido mostrado que a interação entre estas moléculas, além de promover a adesão celular, sinaliza para eventos intracelulares necessários para manutenção da hemostasia ou progressão de processos patológicos (RAO *et al.*, 2007; WEBER *et al.*, 2007).

Muitos estudos têm apontado o envolvimento de várias classes de moléculas de adesão na angiogênese (DEJANA, 2004; DESDROSELLIER & CHERESH, 2010). Membros da superfamília das imunoglobulinas, integrinas, caderinas e selectinas contribuem para cada fase da vascularização tumoral, não somente por mediar as interações célula-célula e célula-matriz, mas também por participar de eventos de sinalização que regulam a extensão e maturação de vasos neo-formados (DEJANA, 2004; DESDROSELLIER & CHERESH, 2010; WOODFIN, 2007).

Como salientado anteriormente, as células endoteliais estão unidas por interações célula-célula e célula-matriz. As principais moléculas de adesão envolvidas na angiogênese, que realizam a interação célula-célula são as moléculas da superfamília das imunoglobulinas, PECAM-1, VCAM-1 e ICAM-1,

além das JAMs, E-selectina e as VE e N-caderinas (DEJANA, 2004; PARK *et al.*, 2010; WEBER *et al.*, 2007) e, dentre as envolvidas na interação célula-matriz, estão as β_1 e β_3 integrinas (DESDROSELLIER & CHERESH, 2010; FRANCALILLA *et al.*, 2009; RAMJAUN & HODIVALA-DILKE, 2009).

As moléculas pertencentes à superfamília das imunoglobulinas são proteínas que possuem um domínio extracelular constituído por várias unidades repetidas e homólogas a domínios de imunoglobulina G, uma região transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática (FRANCAVILLA *et al.*, 2009; HUMPHRIES *et al.*, 2006). São expressas em diferentes tipos celulares, sendo que a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 no endotélio quiescente são baixas, no entanto na vigência de estímulos inflamatórios, suas concentrações na membrana endotelial são aumentadas (HUO & LEY, 2001). Diferentemente, a expressão constitutiva de PECAM-1 é significativa (HUO & LEY, 2001).

A PECAM-1 é uma glicoproteína transmembrana, expressa na superfície das células endoteliais, plaquetas e muitas células hematopoiéticas e em algumas linhagens de linfócitos e tumores (ALBEDA *et al.*, 1990; ILAN & MADRI, 2003; LUTZKY *et al.*, 2006; NEWMAN & NEWMAN, 2003; SHEIBANI & FRAZIER, 1999; TANG *et al.*, 1993). Ela medeia a adesão entre células endoteliais e entre células endoteliais e leucócitos (ALBEDA *et al.*, 1990; FAWCETT *et al.*, 1995; XIE & MULLER, 1993;). A PECAM-1 é constitutivamente contida em vesículas, localizadas logo abaixo da membrana plasmática, as quais tendem a recircular continuamente para a membrana celular, com localização predominante nas bordas, nos sítios de contato célula-célula (DEJANA, 2004). A PECAM-1 é composta por seis domínios extracelulares de imunoglobulina, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático com uma cauda relativamente longa. A interação dos diferentes domínios com seus ligantes específicos determina as sinalizações intracelulares responsáveis pelos diversos efeitos mediados pela molécula, como vasculogênese, angiogênese e regulação da ativação de neutrófilos, monócitos, células T e fagocitose e manutenção da junções interendoteliais (COOK-MILLS & DEEM, 2005; DELISSER *et al.* 1997; ELIAS *et al.*, 1998; FUJIWARA, 2006; SHAY-SALIT *et al.*, 2002; OSAWA *et al.*, 2002). Seu papel modulador sobre a atividade pró-angiogênica das células endoteliais tem sido evidenciado em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. Em camundongos

geneticamente deficientes de PECAM-1, a angiogênese no granuloma formado pelo implante subcutâneo de membrana de polivinil foi reduzido (SOLOWIEJ *et al.*, 2003; WOODFIN, 2007); o alongamento, a emissão de pseudópodes e a migração das células endoteliais suspensas em géis tridimensionais de colágeno e a subsequente formação de tubos foi bloqueada pela incubação com anticorpos anti-PECAM-1. Adicionalmente, a utilização de formas mutantes da molécula, com os domínios intra ou extracelulares bloqueados, mostraram a importância de ambos os domínios para os efeitos. Em conjunto, estes estudos mostraram que os domínios intra e extracelulares da PECAM-1 são importantes para a comunicação em mão dupla, intra e extracelular, que levam à sinalização necessária para migração endotelial (DELISSER *et al.*, 1997; KIM, 1998).

A VCAM-1/CD106 é uma proteína transmembrana com 6 ou 7 domínios de imunoglobulinas extracelulares, um simples domínio transmembrana e um domínio citoplasmático. Esta molécula é expressa em uma variedade de células, incluindo as vasculares e não vasculares, sendo que a sua expressão é aumentada em resposta a citocinas inflamatórias, como pelo TNF- α (SMITH, 2007). A baixa expressão da VCAM-1 na célula endotelial pode ser induzida por estimulação, via síntese protéica, por mediadores inflamatórios (POBER & COTRAN, 1991). As interações entre VCAM-1 e as integrinas VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$) ou $\alpha_4\beta_7$ presentes nos leucócitos estão relacionadas ao processo de transmigração celular entre as junções interendoteliais, até o foco inflamatório (BOCHENER *et al.*, 1991; PETRUZZELLI *et al.*, 1999). Apesar da literatura sobre o papel da VCAM-1 sobre a angiogênese não ser abundante, os dados existentes mostram sua participação, em especial, nas interações homotípicas. KEVIL e colaboradores (2004) mostraram que a VCAM-1 induziu a motilidade da célula endotelial, em um processo dependente de óxido nítrico.

A subfamília da ICAM-1 é constituída de cinco membros (ICAM-1 a ICAM-5), sendo estas moléculas glicoproteínas transmembrana compostas por 2 a 9 domínios da superfamília das imunoglobulinas, uma região transmembrana hidrofóbica e um pequeno domínio citoplasmático. A ICAM-1 é expressa constitutivamente na membrana da célula endotelial, onde participa das ligações célula-célula, e em uma variedade de outras células como fibroblastos, macrófagos e linfócitos, sendo que a sua expressão pode ser

aumentada por estímulos inflamatórios (YANG *et al.*, 2004). Participa das interações leucócito-endotélio como receptor para β_2 integrinas, LFA-1 e MAC-1, e determina um recrutamento seletivo de leucócitos em diferentes situações patológicas (DIAMOND *et al.*, 1991; STAUNTON *et al.*, 1990; YUSUF-MAGAGIANSAR, 2002). Além do papel na interação leucócito-endotélio, a ICAM-1 participa da angiogênese promovendo a migração quimiotática e formação de tubos de células endoteliais (GHO *et al.*, 1999); altera a aderência das células endoteliais, ativando uma série de vias de sinalização intracelulares, desencadeando alterações no citoesqueleto de actina, e a consequente contratilidade da célula (LORENZON *et al.*, 1998).

As 'integrinas' receberam este nome devido a sua importância em manter a integridade da ligação do citoesqueleto com a matriz extracelular (HYNES, 2004). Apresentam-se como heterodímeros transmembrana, compostos pela associação não covalente das subunidades α e β (HYNES, 2002). Cada subunidade da integrina consiste de um domínio extracelular, uma única região transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática (SHATTIL *et al.*, 2010). Em invertebrados, a família é composta de 18 subunidades α e 8 subunidades β que podem se combinar em 24 diferentes heterodímeros (TAKADA *et al.*, 2007). As integrinas estão agrupadas em subgrupos, de acordo com a similaridade das subunidades β , que se ligam a diferentes subunidade α . A subunidade β é suficiente para ligações focais (ligações independentes), enquanto a subunidade α regula a especificidade das interações ligante dependentes (AZUMA *et al.*, 1996). A especificidade das integrinas com os seus ligantes pode tanto ser limitada quanto promíscua. Por exemplo, a integrina $\alpha_5\beta_1$ reconhece apenas a fibronectina como ligante, enquanto a $\alpha_v\beta_3$ interage com diversos ligantes (vitronectina, fibronectina, fibrinogênio e fator de Von Willebrand) (GUO & GIANCOTTI, 2004; ROOPRAI *et al.*, 1999). A maioria das integrinas liga-se através do seu domínio extracelular, com a sequência peptídica Arg-Gly-Asp (RDG), presente em muitas proteínas da matriz extracelular (LABAT-ROBERT, 2002; WATSON *et al.*, 2007). Muitas integrinas ativam as quinases de adesão focal (FAK) e consequentemente, a família das Src quinases (SFKs) (BARCZYK *et al.*, 2010; VAN NIMWEGEN & VAN DE WATER, 1997).

As integrinas podem sinalizar em duas direções, as quais geram diferentes conseqüências biológicas, muito mais amplas que a adesão celular proposta inicialmente (SHATTIL *et al.*, 2010). As integrinas permanecem em um estado quiescente e, uma vez ativadas, desencadeiam mecanismos complexos. Na sinalização “inside-out”, ou seja, de dentro para fora, um ativador intracelular, como a talina ou *kindlinas*, se ligam a cauda β da integrina, levando a variações conformacionais que resultam no aumento da afinidade de ligantes extracelulares. Esta sinalização controla a força da adesão e permite interações suficientemente fortes entre integrinas e proteínas da matriz extracelular, levando as integrinas a transmitirem as forças requeridas para migração e remodelamento da matriz extracelular (BARCZYK *et al.*, 2010). Já na sinalização “outside-in”, ou seja, de fora para dentro, a ligação das integrinas a seus ligantes externos (fibronectina, a vitronectina, fibrinogênio, trombospondina, osteopontina e o fator de Von Willebrand) alteram a polaridade celular, estrutura do citoesqueleto, expressão gênica, sobrevivência e proliferação celular (SHATTIL *et al.*, 2010). Alterações na sinalização induzida pelas integrinas podem contribuir para a progressão de doenças, como doenças autoimunes, trombóticas e câncer (AVRAAMIDES *et al.*, 2008; GUO & GIANCOTTI, 2004)

As integrinas são expressas em diferentes células e cada tipo celular tem o seu próprio repertório. Dentre as integrinas presentes nas células endoteliais estão as $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_1$ (receptores de colágeno), $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ e $\alpha_6\beta_4$ (receptores de laminina), $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ (receptores de vitronectina), $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ (receptores de fibronectina), $\alpha_9\beta_1$ (receptor de osteopontina) (FRIEDLANDER *et al.*, 1995; GONG & CHATTERJEE, 2003; RAMJAUN & HODIVALA-DILKE, 2009). É importante salientar que a maioria destas está envolvida com o processo da angiogênese (AVRAAMIDES *et al.*, 2008)

Muitas evidências sugerem que a subfamília das β_1 integrinas exerça papel relevante na angiogênese. Tem sido demonstrado que em teratoma induzido experimentalmente, bem como a rede microvascular que o circundam, é significativamente menor em animais nocautes para β_1 (BLOCH *et al.*, 1997). Suas ações são amplas, sendo que a $\alpha_5\beta_1$ integrina medeia a proliferação da célula endotelial (METTOUCHI *et al.*, 2001); a $\alpha_3\beta_1$ diminui fatores anti-angiogênicos solúveis, como o inibidor tecidual de metaloproteases 2 (TIMP2)

e as $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_1$ protegem as células endoteliais da apoptose (HONG *et al.*, 2004).

A subfamília das β_3 integrinas é composta por uma grande diversidade de heterodímeros, no entanto, até o momento, a $\alpha_v\beta_3$ integrina parece ser a molécula com maior participação na angiogênese, em especial, nas fases iniciais do processo (FRANCAVILLA *et al.*, 2009). É amplamente expressa em vasos sanguíneos tumorais, mas não em vasculatura quiescente. No entanto, sua expressão nas células endoteliais é estimulada por fatores de crescimento angiogênicos, assim como FGF-2, TNF- α e IL-8 (DESGROSELLIER & CHERESH, 2010). A inibição da $\alpha_v\beta_3$ integrinas por moléculas antagonistas ou por anticorpos interfere drasticamente com a angiogênese (BROOKS *et al.*, 1994, 1995, FRIEDLANDER *et al.*, 1995), e muitos destes estão em diferentes fases de estudos pré-clínicos e clínicos (CHEN *et al.*, 2008; GRAMOUN *et al.*, 2007; GUTHEIL *et al.*, 2000; NABORS *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 1990; TRIKHA *et al.*, 2004). Suas ações estão relacionadas à interação com os VEGFR2, alterando vias de transdução de sinal intracelulares e o recrutamento de proteínas importantes para regiões promotoras deste receptor de fator de crescimento (MACDONALD *et al.*, 2008), a interação com o sítio proteolítico da metaloprotease-2 (MMP 2), aumenta a degradação da matriz extracelular e migração das células endoteliais (DAVIS, 1992; BROOKS *et al.*, 1994); a regulação da COX-2 (DORMOND *et al.*, 2002) e o efeito citoprotetor em células endoteliais (WANG & MILNER, 2006).

A síntese da literatura apresentada acima mostra a importância das moléculas de adesão nas interações homo e heterotípicas que ocorrem na angiogênese, não só mediando as adesões celulares, mas também, pela indução de sinalização intracelular e extracelular envolvida no processo. Desta forma, interferências nas ativações/ações destas moléculas constituem alvos terapêuticos importantes na inibição da angiogênese, em especial aos ligados ao câncer.

Em conjunto, a revisão da literatura realizada na Introdução deste trabalho teve por objetivo associar a importância de serinoproteases e seus inibidores sobre a angiogênese induzida, em especial, pelo VEGF, focando algumas funções da célula endotelial relevantes para o processo. Do exposto, fica evidente que o processo de angiogênese é muito complexo e que os

inibidores de serinoproteases podem afetar a evolução do mesmo por diferentes mecanismos, o que torna este grupo de inibidores enzimático bastante atrativo para a quimioterapia, especialmente em casos de câncer ou de doenças inflamatórias crônicas.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi caracterizar as atividades do Amblyomin-X, um inibidor de serinoprotease recombinante, sobre a angiogênese *in vivo* induzida pelo fator de crescimento VEGF, além de investigar os mecanismos de ação do Amblyomin-X sobre funções da célula endotelial envolvidas neste processo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização deste trabalho, foram empregados camundongos Swiss machos com peso entre 20-30g. 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 os animais foram anestesiados com uma de ketamina:xilazina, 20:2 mg/kg, respectivamente.

3.2 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 por processo fermentativo em bioreator, empregando-se leveduras da espécie *Pichia pastoris*. Os processos de produção e de purificação foram realizados no laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, em sistema escalonável e validado.

O Amblyomin-X foi diluído com PBS e utilizado nas concentrações de 10 e 100ng/10µL, para os modelos experimentais *in vivo*, e 1, 10, 100 e 1000 ng/mL para os experimentos *in vitro*.

3.3 Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)

O Fator de Crescimento do Endotélio Vascular-A (VEGF-A; eBioscience; 34-8351-85) recombinante foi empregado como agente indutor/estimulador da angiogênese *in vivo* e como substância estimulatória para os ensaios *in vitro*. O VEGF foi diluído em PBS estéril a 4°C e utilizado nas concentrações de 1 a 100

ng/10 μ L, nos ensaios *in vivo*, e nas concentrações de 10 a 50 ng/mL nos ensaios *in vitro*.

3.4 Células endoteliais da linhagem 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). Alíquotas das células desta linhagem (t-End) foram mantidas em DMSO e SFB a -80°C até o momento de uso. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB em atmosfera úmida, 5% de CO₂, a 37°C. As culturas foram empregadas nos ensaios após o segundo repique. As células endoteliais desta linhagem foram gentilmente doadas pela Professora Dra. Catarina de Fátima Pereira Teixeira do Instituto Butantan.

3.5 Angiogênese *in vivo*: modelo da câmara dorsal

3.5.1 Implante da Câmara Dorsal

O tecido dorsal dos camundongos foi depilado com creme depilatório (Veet®) e as manipulações cirúrgicas na pele foram realizadas para implantação das câmaras dorsais (Institute for Surgical Research, University of Munich, Germany) conforme descrito por HARDER *et al.*, 2004. Resumidamente, após a depilação, a pele da região dorsal do animal foi presa por fios de sutura para permanecer completamente esticada. Inicialmente, a parte dorsal da câmara foi iserida e fixada com parafusos no tecido. Posteriormente, foi retirada a parte frontal da pele e, em seguida, a parte frontal da câmara foi fixada, permitindo assim, uma visualização perfeita da microcirculação através do seu visor de vidro. Os tratamentos foram iniciados somente dois dias após o procedimento de implante da câmara dorsal, pois este período é necessário para a recuperação da inflamação local de pequena intensidade. As imagens ilustrativas seqüenciais da preparação tecidual são mostradas na Figura 4.

Figura 4 Imagens sequenciais do procedimento do implante da câmara dorsal em camundongos Swiss. Os animais foram depilados e sua pele dorsal foi presa por fios de sutura para permanecer completamente esticada. Inicialmente a placa traseira da câmara foi inserida, com seus respectivos parafusos. Posteriormente, a camada frontal da pele foi retirada, na região onde fica o visor de vidro da câmara, permitindo assim, uma perfeita visualização da microcirculação.

3.5.2 Delineamento Experimental

3.5.2.1 Padronização da concentração de VEGF

Para os ensaios de angiogênese *in vivo* foram testadas três concentrações de VEGF 1, 10 e 100ng/10μL na microcirculação dorsal de camundongos. O protocolo de tratamento está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 Protocolo de padronização da concentração de VEGF utilizada na microcirculação dorsal de camundongos

Dia 01	Dia 03	Dia 05	Dia 07	Dia 09
Implante da câmara	Captura da imagem da microcirculação			Captura da imagem da microcirculação
	PBS ou VEGF 1, 10 ou 100ng/10µL	PBS ou VEGF 1, 10 ou 100ng/10µL	PBS ou VEGF 1, 10 ou 100ng/10µL	

3.5.2.2 Tratamento prévio/simultâneo com Amblyomin-X

O tratamento com o Amblyomin-X foi realizado de maneira prévia ao tratamento com o VEGF na microcirculação dorsal de camundongos. O protocolo de tratamento está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 Protocolo de tratamento prévio/simultâneo na microcirculação dorsal de camundongos

Dia 01	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 07	Dia 09
Implante da câmara	Captura da imagem da microcirculação				Captura da imagem da microcirculação
	PBS ou Amblyomin-X (100ng/10µL)	PBS ou Amblyomin-X (100ng/10µL)	PBS + VEGF (10ng/10µL) ou Amblyomin-X (100ng/10µL) + VEGF (10ng/10µL)	PBS + VEGF (10ng/10µL) ou Amblyomin-X (100ng/10µL) + VEGF (10ng/10µL)	

3.5.2.3 Tratamento simultâneo com Amblyomin-X e VEGF

O tratamento com o Amblyomin-X foi realizado de maneira simultânea ao tratamento com o VEGF na microcirculação dorsal de camundongos. O protocolo de tratamento está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 Protocolo de tratamento simultâneo na microcirculação dorsal de camundongos

Dia 01	Dia 03	Dia 05	Dia 07	Dia 09
Implante da câmara	Captura da imagem da microcirculação			Captura da imagem da microcirculação
	PBS ou VEGF (10ng/10µL) e Amblyomin-X (10 ou 100ng/10µL)	PBS ou VEGF (10ng/10µL) e Amblyomin-X (10 ou 100ng/10µL)	PBS ou VEGF (10ng/10µL) e Amblyomin-X (10 ou 100ng/10µL)	

3.5.2.4 Tratamento posterior/simultâneo com Amblyomin-X

O tratamento com o Amblyomin-X foi realizado de maneira posterior ao tratamento com o VEGF na microcirculação dorsal de camundongos. O protocolo de tratamento está apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 Protocolo de tratamento posterior/simultâneo na microcirculação dorsal de camundongos

Dia 01	Dia 03	Dia 04	Dia 05	Dia 07	Dia 09
Implante da câmara	Captura da imagem da microcirculação				Captura da imagem da microcirculação
	PBS ou VEGF (10ng/10µL)	PBS ou VEGF (10ng/10µL)	PBS + VEGF (10ng/10µL) ou Amblyomin-X (100ng/10µL) + VEGF (10ng/10µL)	PBS + VEGF (10ng/10µL) ou Amblyomin-X (100ng/10µL) + VEGF (10ng/10µL)	

3.5.3 Aquisição e análise das imagens

As imagens da rede microcirculatória, da pele da região dorsal dos camundongos, foram obtidas em câmara digital (Sony – Cyber-Shot – 7.2 Mega Pixels/ Optical 3X).

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 dimensões das imagens e a quantificação precisa dos números de vasos em cada segmento da malha (1 cm²). Esta técnica foi adaptada de Dellian *et al.*, 1996. A Figura 5 apresenta, de maneira representativa, a malha digital utilizada para a quantificação dos vasos. A imagem era ampliada 200x e posteriormente, eram quantificados o número de quadrados (preenchidos com 50% ou mais de área apta a ser contada) e o número de vasos presentes em cada quadrado. O índice de vasos de cada imagem era obtido pelo cálculo: Índice = número de vasos nos quadrados/ número de quadrados que apresentam vasos.

Figura 5 Imagem representativa de uma foto da microcirculação dorsal de camundongo e da malha digital utilizada para a quantificação dos vasos.

3.6 Angiogênese *in vivo*: modelo da membrana corioalantóica (CAM) de embriões de galinha

3.6.1 Preparação do ovo

Ovos galados da espécie *Gallus gallus* foram incubados em chocadeira a 37,7°C em atmosfera com 65% de umidade durante três dias. No quarto dia, em fluxo laminar, foi feito um orifício na casca dos ovos e retirados cerca de 3-4mL de albumina. Em seguida, foi feita uma janela na casca na região superior do ovo, para a observação da membrana corioalantóica e confirmação da presença do embrião. Posteriormente, estes ovos foram novamente incubados nas mesmas condições descritas anteriormente e no décimo primeiro dia,

discos de celulose estéreis, com cerca de 2 mm, contendo 10 μ L dos tratamentos (Solução de Ringer, VEGF 25ng/10 μ L e Amblyomin-X 100ng/10 μ L), foram adicionados à membrana corioalantóica. As imagens sequenciais ilustrativas do ensaio de angiogênese no modelo de membrana corioalantóica são mostradas na Figura 6.

Figura 6 Imagens sequenciais do procedimento do implante dos discos de celulose na membrana corioalantóica (CAM) de embriões de galinha. Os ovos foram incubados em chocadeira até o quarto dia, quando a albumina foi retirada e a janela na casca foi realizada. Após um período de incubação de mais sete dias, os discos de celulose foram implantados e o tratamento realizado. Posteriormente, a CAM juntamente com os filtros foi removida, fixada e fotografada em lupa acoplada a câmara fotográfica.

3.6.2 Delineamento Experimental

O tratamento com o Amblyomin-X foi realizado de maneira simultânea ao tratamento com o VEGF na CAM. O protocolo de tratamento está apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 Protocolo de tratamento simultâneo do Amblyomin-X com o VEGF na CAM

Dia 01	Dia 04	Dia 11	Dia 12	Dia 13	Dia 14
Incubação dos ovos	Retirada da albumina e abertura da janela	Implante dos discos de celulose e aplicação dos tratamentos	Aplicação dos tratamentos	Aplicação dos tratamentos	Fixação das membranas e obtenção das imagens

3.6.3 Aquisição e análise das imagens

Decorridas 24 horas do último tratamento, as membranas foram fixadas com paraformaldeído e cuidadosamente retiradas da parte interna do ovo e fotografadas em lupa (Nikon, aumento de 1x) acoplada à câmera fotográfica.

A quantificação do número de vasos na membrana corioalantóica foi realizada da mesma maneira que a descrita para câmara dorsal.

3.7 Ensaios de citometria de fluxo

Todos os ensaios foram realizados no citômetro de fluxo FACS Canto (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) e analisados usando o software Flow Jo (versão 9.1). Os dados de 10.000 células foram obtidos e somente as células morfolologicamente viáveis foram consideradas para análise.

3.7.1 Viabilidade Celular

A viabilidade das células endoteliais foi determinada por ensaios de citometria de fluxo, usando marcação com a proteína Anexina-V e com iodeto de propídio (PI), para a mensuração da apoptose e necrose celular, respectivamente. Células t-End ($1,25 \times 10^5$) foram plaqueadas (com RPMI adicionado de SFB 10%) e posteriormente tratadas com equivalentes volumes de PBS ou Amblyomin-X (100 e 1000ng/mL) por 72 horas, uma vez que este foi o maior tempo de incubação durante os ensaios. 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, solução tampão de ligação de anexina foi adicionada ao tubos e as amostras foram lidas em citômetro de fluxo.

3.7.2 Ensaio de Citoproteção

A citoproteção da célula endotelial t-End foi avaliada por ensaios de citometria de fluxo utilizando a marcação com a proteína Anexina V e PI. Estas células foram plaqueadas ($1,25 \times 10^5$) e após a sua aderência, incubadas com meio de cultura RPMI enriquecido com 1% ou 10% de SFB. Concomitantemente, as células foram incubadas com equivalentes volumes de PBS ou com Amblyomin-X (100ng/mL). A cultura foi mantida por mais 24 horas em meio de cultura RPMI enriquecido com 1% ou 10% de SFB. Posteriormente, as células foram transferidas para tubos específicos para o ensaio de citometria de fluxo e incubadas com Anexina-V, conjugada com o fluorocromo FITC, previamente diluída em tampão de ligação para anexina (1:100) e 10µL de PI na concentração de 50µg/mL. Após 15 minutos de incubação, à temperatura ambiente, solução tampão de ligação de anexina foi adicionada aos tubos e as amostras foram lidas em citômetro de fluxo.

3.7.3 Proliferação Celular

Os efeitos do Amblyomin-X sobre a proliferação celular foi realizada pela marcação de células endoteliais (t-End) com diacetato de carboxi-fluoresceína, succinimidil éster (CFSE - Molecular Probe). Este fluoróforo (CFSE) penetra nas células por difusão passiva e seu grupo acetato é clivado pelas esterases intracelulares. Subseqüentemente o grupo succinimidil éster reage com aminas celulares formando conjugados que são retidos nas células durante o desenvolvimento e a meiose. A marcação é herdada pelas células filhas após a divisão ou fusão celular. Desta forma, ocorre uma diminuição da intensidade de fluorescência ao longo da proliferação celular.

Células endoteliais foram plaqueadas (placa de 6 poços) e, após a sua aderência, foram empregadas no ensaio. As células foram incubadas com solução de CFSE (5 μ M), previamente diluído em PBS, em volume final de 1mL, por 15 minutos, 37°C. Em seguida, 1mL de meio de cultura (RPMI 1640 e 10% SFB) foi adicionado em cada poço e a placa foi mantida por mais 30 minutos à 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após este período, as células foram lavadas com PBS e incubadas com meio de cultura acrescido ou não de Amblyomin-X (1, 10, 100 ou 1000 ng/10 μ L) e/ou VEGF (50ng/mL). A proliferação celular foi monitorada nos tempos de 0, 24, 48 ou 72 horas por citometria de fluxo (excitação: 492 nm e emissão: 517 nm).

3.7.4 Ciclo Celular

Para a avaliação do ciclo celular, 1,25x10⁵ células endoteliais t-End foram plaqueadas e após a aderência celular, tratadas com Amblyomin-X (100 ng/poço) e/ou com VEGF (50 ng/mL) por 24, 48 ou 72 horas. Posteriormente, as células foram incubadas por 1 hora com PBS e metanol. Após este período, as mesmas foram lavadas com PBS e resuspendidas em 200 μ L de uma solução de PI (10 μ g/mL em PBS) e 20 μ L de RNase (15 μ g/mL). Esta suspensão foi incubada a 4°C por uma hora antes da realização da leitura em citômetro de fluxo.

3.7.5 Avaliação da expressão de moléculas de adesão

Para a quantificação das moléculas de adesão das células endoteliais, $1,25 \times 10^5$ células endoteliais t-End foram plaqueadas, e aguardou-se um período de 12 horas para a adesão celular. Após este período, as células foram tratadas com Amblyomin-X (100 ng/poço) por 8 horas e, concomitantemente, estimuladas ou não com VEGF (10 ng/mL). O tempo de incubação de 8 horas com o estímulo VEGF foi determinado de acordo com uma curva tempo-resposta, onde as células apresentaram expressão significativa das moléculas de adesão avaliadas.

Após o período de incubação de 8 horas, as células endoteliais foram lavadas com PBS, desprendidas da placa de cultura com auxílio de *cell scraper* e transferidas para tubos de citometria de fluxo. Posteriormente, as células foram incubadas por 20 minutos a 4°C, sob ausência de luz, com anticorpos específicos (Becton, Dickinson and Company): anti-PECAM-1 (CD31), anti-VCAM-1 (CD106), anti-ICAM-1 (CD54), anti- β_3 integrina (CD61) ou anti- β_1 integrina (CD29). Todos os anticorpos foram utilizados na diluição de 1:100. Dos anticorpos utilizados somente o anticorpo para a molécula PECAM-1 estava conjugado com o fluorocromo PE e os demais estavam conjugados com o fluorocromo FITC. Ao término da incubação, as células foram fixadas pela adição de 100 μ L de uma solução de *p*-formaldeído a 2% e as expressões foram quantificadas em citômetro de fluxo.

3.8 Avaliação da aderência celular

Após as células endoteliais (t-End) atingirem confluência, estas foram incubadas na presença de PBS, VEGF (50 ng/mL) e/ou Amblyomin-X (100 ng/mL) por 2h a 37°C. Após este período, com auxílio de *cell scraper*, as células 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, o meio de cultura foi removido e as células foram cuidadosamente lavadas com solução de PBS. Posteriormente, 100 μ L de uma solução 0,1% de corante cristal violeta (20% metanol/água) foram adicionados

a cada poço por 10 minutos à temperatura ambiente. Após o término da incubação, o corante cristal violeta foi cuidadosamente aspirado e cada poço foi lavado 10 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. Os resultados foram expressos como densidade óptica, que foi calculado como: $DO = DO_{580nm} - DO_{690nm}$.

3.9 Avaliação da formação de tubos

Inicialmente, o Matrigel® (Becton, Dickinson and Company) foi diluído 1:2 vezes com meio de cultura RPMI 1640 e 250µL desta solução foi plaqueada para os poços de uma placa de cultura de 24 poços. A placa de cultura foi incubada por 1h a 37°C para permitir a polimerização do Matrigel®. Posteriormente, foi adicionado $2,5 \times 10^4$ células na presença dos tratamentos PBS, VEGF (50ng/mL) e/ou Amblyomin-X (100ng/mL), totalizando 400µL por poço, sobre o Matrigel®. As células foram incubadas com os tratamentos por 24h a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Ao término da incubação, 3 campos diferentes de cada poço foram fotografadas (aumento de 40x) e as imagens foram utilizadas para a quantificação das estruturas tubulares. A formação dos tubos foi calculado em relação ao grupo controle, que foi considerado como 100%.

3.10 Determinação da expressão gênica das moléculas de adesão PECAM-1, VCAM-1 e ICAM-1 em células endoteliais

As expressões do RNAm para PECAM-1, VCAM-1 e ICAM-1 foram determinadas por reação de polimerização em cadeia (PCR) em células endoteliais t-End. Após o período de tratamento de 2 horas com PBS (controle), VEGF (10ng/mL) ou VEGF e Amblyomin-X (100ng/mL) o RNA total foi isolado com o reagente Trizol® (Invitrogen, USA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Em resumo, a transcrição reversa foi realizada

utilizando 2µg de RNA e uma mistura dos seguintes reagentes: 20 µg/mL de Oligo(dT)₁₅, 200 U de transcriptase reversa de M-MLV (20mM de Tris-HCl, pH 7.5, 200mM NaCl, 0,1mM EDTA, 1mMDTT, 0,01% Nonidet® P-40 e 50% de glicerol), tampão de reação 5x (50mM Tris-HCl, pH 8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂ e 2mM de DDT), 2mM dNTP em volume final de 25µL. A reação foi incubada por 5 minutos a 70 °C, seguindo por aquecimento a 42 °C por 60 minutos. O cDNA foi armazenado a -20 °C até a realização da reação de PCR.

Para a realização da reação de PCR, 2,5 µg/mL de cDNA foram incubados com 2,5 U de taq DNA Polimerase, 0,4 µL de 3'- e 5'- primers específicos e 200 µM de mistura de dNTP em tampão termofílico 5x (pH8.5) para DNA polimerase contendo 1,5 mM de MgCl₂. As seguintes sequências de primers foram utilizadas: UBC, 5' AGCCCAGTGTACCACCAAG 3' (sense) e 5' ACCCAAGAACAAGCACAAGG 3' (antisense), PECAM-1, 5'-TGCAGGAGTCCTTCTCCACT-3' (sense) e 5'-ACGGGTTGATTCCACTTTGC-3' (antisense), VCAM-1, 5'-ATTTTCTGGGGCAGGAAGTT-3' (sense) e 5'-ACGTCAGAACCAACCG ATTCC-3' (antisense), ICAM-1, 5'-TTCACACTGAATGCCAGCTC-3' (sense) e 5'-GTCTGCTGCGACCCCTCTTG-3' (antisense). As características dos ciclos de amplificação estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 Característica dos ciclos de amplificação das reações de RT-PCR

Primer	Número de Ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão
PECAM-1	40	94 °C/60s	53,1 °C	72 °C/60s
VCAM-1	40	94 °C/60s	55,4 °C	72 °C/60s
ICAM-1	40	94 °C/60s	57,6 °C	72 °C/60s
UBC	40	94 °C/60s	54,2 °C	72 °C/60s

Os reagentes empregados na síntese do cDNA e na reação de PCR foram obtidos da Promega Corporation, Madison, WI, USA.

3.11 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) e foram analisados estatisticamente pela Análise de Variância com comparações múltiplas (ANOVA), seguido do teste de Tukey-Kramer, quando necessário. O programa GraphPad Prisma® versão 4.00 (GraphPad Prism Software Inc, 1992-2003) foi utilizado para conduzir as análises estatísticas.

4. RESULTADOS

4.1 Angiogênese *in vivo*: modelo da câmara dorsal

4.1.1 Padronização da concentração de VEGF

A concentração ideal de VEGF para estimular a angiogênese, *in vivo*, no modelo de câmara dorsal, foi determinada a partir de uma curva concentração-resposta.

A aplicação tópica de 1ng/10µL de VEGF não induziu a formação de novos vasos na microcirculação da pele, da região dorsal, dos camundongos em relação ao controle (PBS). Por outro lado, as aplicações de 10 e 100ng/10µL de VEGF induziram a formação de novos vasos em relação ao controle e em relação ao número de vasos determinados antes da aplicação do VEGF. Os efeitos observados sobre a angiogênese com o emprego de 10 e 100 ng/10µL de VEGF foram equivalentes e, por esta razão, a concentração de 10ng/10µL foi definida como a mais apropriada para a realização dos demais ensaios (Figura 7). Na Figura 8 estão as imagens representativas da microcirculação de animais controles e tratados com 10ng/10µL de VEGF.

Figura 7 Índice do número de vasos da microcirculação subcutânea dorsal de camundongos após tratamento tópico com PBS ou VEGF, a cada 48 horas. As imagens da rede microcirculatória foram obtidas antes do início dos tratamentos e a cada 48 horas, até 48 horas após a última aplicação de PBS ou Amblyomin-X. Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs PBS.

Figura 8 Imagens representativas dos efeitos do VEGF (10ng/10µL), aplicado topicamente, sobre a rede microcirculatória dorsal de camundongos Swiss. As imagens foram capturadas por câmera digital antes e após o início dos tratamentos (48 horas após a terceira aplicação de PBS ou VEGF) e analisadas pelo programa de análise de imagens. As imagens da parte superior do painel representam a coloração normal do tecido e as da parte inferior do painel são as mesmas imagens, obtidas após inversão de cores.

4.1.2 Efeito do Amblyomin-X sobre a angiogênese induzida pelo VEGF

Para elucidar os mecanismos de ação do Amblyomin-X sobre a angiogênese *in vivo*, diferentes protocolos de tratamentos foram empregados.

4.1.2.1 Efeitos do tratamento prévio/simultâneo do Amblyomin-X com VEGF

Os animais foram tratados com PBS (controles) ou Amblyomin-X (100ng/10µL) a cada 24 horas, totalizando 2 administrações de cada tratamento. Em seguida, foram tratados por mais duas vezes com PBS ou Amblyomin-X simultaneamente com VEGF (10ng/10µL), sendo uma administração a cada 48 horas. As imagens capturadas a cada 24

horas, mostraram que o tratamento com VEGF aumentou o número de vasos recém-formados em relação a animais tratados com PBS. Diferentemente, em animais tratados com Amblyomin-X, houve inibição do número de vasos, após a aplicação de VEGF, em relação aos animais tratados com PBS/VEGF ou em relação aos valores obtidos antes do início dos tratamentos (PBS) (Figura 9). A Figura 10 apresenta as imagens representativas da microcirculação de animais tratados com solução PBS ou com Amblyomin-X e, posteriormente, com VEGF.

Figura 9 Efeito do tratamento prévio/simultâneo com Amblyomin-X sobre a angiogênese induzida pelo VEGF no tecido subcutâneo dorsal de camundongos. Os animais foram tratados, duas vezes, com Amblyomin-X (100ng/10µL) ou PBS a cada 24 horas. Em seguida, foram tratados mais duas vezes, com Amblyomin-X ou PBS, simultaneamente com VEGF (10ng/10µL). Os valores expressam a variação do índice do número de vasos antes e 48 horas após o último tratamento de 6 animais por grupo. Os resultados representam a média $\pm$ e.p.m.. * $p < 0,05$ vs PBS e ## $p < 0,01$ vs PBS + VEGF.

Figura 10 Imagens representativas dos efeitos do Amblyomin-X (tratamento prévio/simultâneo) sobre a formação de novos vasos induzidos pelo VEGF no tecido subcutâneo dorsal de camundongos. Os animais foram tratados, duas vezes, com Amblyomin-X (100ng/10 μ L) ou PBS a cada 24 horas. Em seguida, foram tratados mais duas vezes, com Amblyomin-X ou PBS, simultaneamente com VEGF (10ng/10 μ L). As imagens da parte superior do painel representam a coloração normal do tecido e as da parte inferior do painel são as mesmas imagens, obtidas após inversão de cores.

4.1.2.2 Efeitos do tratamento simultâneo do Amblyomin-X com VEGF

Os animais foram tratados com PBS (controles) ou Amblyomin-X (10 ou 100ng/10 μ L) simultaneamente com VEGF (10ng/10 μ L), uma vez a cada 48 horas, totalizando três administrações. As imagens capturadas a cada 48 horas mostraram que o tratamento com PBS e VEGF aumentou o número de vasos recém-formados em relação ao PBS (controles). Diferentemente, em animais tratados concomitantemente com Amblyomin-X e VEGF, houve redução do número de vasos em relação aos animais tratados com PBS ou em relação aos valores obtidos antes do início dos tratamentos (Figura 11). A Figura 12 apresenta as imagens representativas, capturadas por câmera digital, de animais tratados com PBS e VEGF e com Amblyomin-X e VEGF.

Figura 11 Efeito do tratamento simultâneo com Amblyomin-X e VEGF sobre a angiogênese no tecido subcutâneo dorsal de camundongos. Os animais foram tratados, três vezes, com PBS ou Amblyomin-X (10 ou 100ng/10µL) na vigência de VEGF (10ng/10 µL), a cada 48 horas. Os valores expressam a variação do índice do número de vasos antes e 48 horas após o último tratamento de 6 animais por grupo. Os resultados representam a média $\pm$ e.p.m.. * $p < 0,05$ vs PBS e ### $p < 0,001$ vs PBS + VEGF.

Figura 12 Imagens representativas dos efeitos do Amblyomin-X (tratamento simultâneo) sobre a angiogênese induzida pelo VEGF no tecido subcutâneo dorsal de camundongos. Os animais foram tratados, três vezes, com PBS ou Amblyomin-X (10 ou 100ng/10 μ L) na vigência de VEGF (10ng/10 μ L), a cada 48 horas. As imagens da parte superior do painel representam a coloração normal do tecido e as da parte inferior do painel são as mesmas imagens, obtidas após inversão de cores.

4.1.2.3 Efeitos do tratamento posterior/simultâneo do Amblyomin-X com VEGF

Inicialmente a formação de novos vasos foi induzida pela administração de VEGF (10ng/10µL), uma vez a cada 24 horas, totalizando duas administrações. Animais controles receberam apenas PBS. Em seguida, os animais foram tratados uma vez a cada 24 horas com PBS ou Amblyomin-X, simultaneamente com VEGF (10ng/10µL), totalizando mais duas administrações. As imagens, capturadas a cada 24 horas, mostraram que o tratamento com VEGF aumentou o número de vasos recém-formados em relação aos animais controles (PBS). Igualmente, em animais tratados com Amblyomin-X, houve aumento do número de vasos em relação aos animais tratados apenas com PBS ou em relação aos valores obtidos antes do início dos tratamentos (Figura 13). A Figura 14 ilustra as imagens representativas, capturadas por câmera digital, de animais tratados com VEGF e posteriormente com VEGF e Amblyomin-X.

Figura 13 Efeito do tratamento posterior/simultâneo com Amblyomin-X sobre a formação de novos vasos induzidos pelo VEGF no tecido subcutâneo dorsal de camundongos. Os animais foram tratados, duas vezes, com PBS ou VEGF (10ng/10µL) a cada 24 horas. Em seguida, foram tratados mais duas vezes, com Amblyomin-X ou PBS, simultaneamente com VEGF (10ng/10µL). Os valores expressam a variação do índice do número de vasos antes e 48 horas após o último tratamento de 6 animais por grupo. Os resultados representam a média $\pm$ e.p.m.. ** $p < 0,01$ vs PBS.

Figura 14 Imagens representativas dos efeitos do Amblyomin-X (tratamento posterior/simultâneo) sobre a formação de novos vasos induzidos pelo VEGF no tecido subcutâneo dorsal de camundongos. Os animais foram tratados, duas vezes, com VEGF (10ng/10 μ L) ou PBS a cada 24 horas. Em seguida, foram tratados mais duas vezes, com Amblyomin-X ou PBS, simultaneamente com VEGF (10ng/10 μ L). As imagens da parte superior do painel representam a coloração normal do tecido e as da parte inferior do painel são as mesmas imagens, obtidas após inversão de cores.

4.2 Angiogênese *in vivo*: membrana corioalantóica de ovos

4.2.1 Efeito do Amblyomin-X sobre a angiogênese em membrana corioalantóica de ovos

Com o objetivo de investigar os efeitos do Amblyomin-X sobre a angiogênese induzida pelo VEGF, em um modelo experimental distinto do tecido subcutâneo dorsal de camundongos, membranas corioalantóicas foram tratadas com solução de Ringer (controles), VEGF (0,25ng/10 μ L em solução de Ringer), Amblyomin-X (100ng/10 μ L) e Amblyomin-X (100ng/10 μ L) na presença de VEGF (0,25ng/10 μ L).

A administração de Amblyomin-X não afetou o número de vasos na membrana corioalantóica. O tratamento com VEGF foi efetivo na indução da

angiogênese, uma vez que aumentou o número de vasos nas membranas corioalantóicas. Por outro lado, o tratamento concomitante com Amblyomin-X e VEGF inibiu o efeito do VEGF, já que o número de vasos foi menor em relação ao grupo que recebeu somente o VEGF (Figura 15). A Figura 16 mostra as imagens representativas, obtidas por câmera digital, de membranas corioalantóicas tratadas com solução de Ringer (controles), Amblyomin-X, VEGF ou Amblyomin-X adicionado de VEGF.

Figura 15 Efeito do Amblyomin-X sobre a angiogênese induzida pelo VEGF em membrana corioalantóica de embriões de galinha. As membranas foram tratadas com solução de Ringer ou solução de Ringer + VEGF (0,25ng/10µL) (controles) ou com Amblyomin X (100ng/10µL) ou Amblyomin-X + VEGF durante 3 dias, 1 vez ao dia. As imagens foram capturadas por câmera digital 24 horas após o último tratamento e analisadas pelo sistema de análise de imagem. Os valores expressam a variação do número de vasos após o tratamento de 6 membranas por grupo. Os resultados representam a média $\pm$ e.p.m. ***P<0.001 vs Ringer e ### P<0.001 vs Ringer + VEGF.

Figura 16 Imagens representativas dos efeitos do Amblyomin-X (tratamento simultâneo) sobre a angiogênese induzida pelo VEGF em membrana corioalantóica de embriões de galinha. Solução de Ringer, VEGF (0,25ng/10 μ L), Amblyomin-X (100ng/10 μ L) e Amblyomin-X e VEGF foram aplicados, a cada 24 horas, em papel de filtro, posicionados sobre a CAM, por 3 dias consecutivos. As imagens (aumento de 5x) foram obtidas 24 horas após o último tratamento. As imagens da parte superior do painel representam a coloração normal do tecido e as da parte inferior do painel são as mesmas imagens, obtidas após inversão de cores.

4.3 Investigações dos mecanismos de ação do Amblyomin-X *in vitro*

4.3.1 Efeito do tratamento com Amblyomin-X sobre a viabilidade de células endoteliais t-End

Os efeitos do Amblyomin-X sobre a viabilidade das células endoteliais t-End foram investigados, por ensaios de citometria de fluxo, após a incubação destas células com Amblyomin-X nas concentrações de 100 e 1000ng/mL por um período de 72 horas. Os dados obtidos demonstraram que a proteína não apresentou toxicidade para esta linhagem celular, uma vez que a porcentagem de células viáveis foi similar nos grupos estudados (Figura 17). As células não apresentaram marcação para Anexina V (apoptose) ou para PI (necrose) (dados não mostrados).

Figura 17 Efeitos do Amblyomin-X sobre a viabilidade de células endoteliais. Células t-End ($1,25 \times 10^5$ /poço) foram incubadas com PBS ou com as diferentes concentrações de Amblyomin-X a 37°C em atmosfera úmida e 5% de CO₂, por 72 horas. 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.

4.3.2 Efeito do Amblyomin-X sobre a morte induzida em células endoteliais

O possível efeito citoprotetor do Amblyomin-X foi investigado em células endoteliais. Para tanto, células t-End foram incubadas com 1% de SFB e com Amblyomin-X (100ng/mL) simultaneamente. Os dados obtidos mostraram que as células incubadas com meio de cultura adicionado de 1% SFB apresentaram diminuição significativa na viabilidade em relação ao grupo que foi incubado com meio de cultura adicionado de 10% de SFB. O tratamento com o Amblyomin-X não foi capaz de alterar a viabilidade das células em relação ao seu grupo controle.

A análise diferencial das células não viáveis, cerca de 50% do total, mostrou que o protocolo experimental empregado para induzir morte celular, induziu apoptose em cerca de 3%, apoptose tardia em cerca de 8% e necrose no restante das células. O tratamento com Amblyomin-X protegeu as células da morte por apoptose e apoptose tardia, mas não inibiu a necrose (Figura 18).

Figura 18 Efeitos do tratamento com Amblyomin-X sobre a morte de células endoteliais induzida por meio de cultura carenciado. Células t-End ($1,25 \times 10^5$ /poço) foram incubadas com 1 ou 10% de SFB e concomitantemente com PBS ou Amblyomin-X (100ng/10 μ L) por 48 horas. Posteriormente, as células foram incubadas por mais 24 horas com meio de cultura adicionado de 1 ou 10% de SFB. 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 três ensaios independentes. * $p < 0,05$ vs PBS+SFB 10%, # $p < 0,05$ vs PBS+SFB 1%, ++ $p < 0,01$ vs Amblyomin-X + SFB 10%.

4.3.3 Efeito do Amblyomin-X sobre a proliferação da célula endotelial

Os ensaios de proliferação celular foram implantados no laboratório durante o desenvolvimento deste projeto. Desta forma, inicialmente as condições experimentais bem como as concentrações de VEGF foram padronizadas. A Figura 19 mostra que as células incorporaram o fluoróforo, marcador da proliferação celular, e que sua intensidade de fluorescência ao longo do tempo foi decrescendo, mostrando a eficiência do ensaio.

Subseqüentemente, os ensaios foram conduzidos em células tratadas com PBS (controles) ou Amblyomin-X. Os resultados obtidos mostraram que os tratamentos com Amblyomin-X, nas concentrações de 1ng, 10ng, 100ng e 1000ng/mL, durante os períodos de 24, 48 e 72 horas não alteraram a taxa de proliferação celular da linhagem t-End quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 20).

Por outro lado, na vigência do estímulo do fator de crescimento VEGF, o tratamento com Amblyomin-X reduziu, de maneira significativa, a proliferação das células endoteliais. A intensidade de fluorescência foi maior nas culturas celulares incubadas com o inibidor de serinoprotease, na vigência de VEGF, nos tempos de 48 horas (Figura 21, B) e 72 horas (Figura 21, C) após os tratamentos, em relação à observada em culturas de células tratadas com PBS.

Figura 19 Caracterização do modelo de proliferação de células t-End. Células t-End ($1,25 \times 10^5$ /poço) foram incubadas com CFSE por 45 minutos a 37°C , 5% de CO_2 . A intensidade de fluorescência foi monitorada em 0, 24, 48 ou 72 horas após a incubação, por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de três ensaios independentes (** $p < 0,001$ vs tempo zero).

Figura 20 Efeitos do Amblyomin-X sobre a proliferação de células endoteliais. Células t-End ($1,25 \times 10^5$ /poço) foram incubadas com CFSE por 45 minutos a 37°C em 5% de CO_2 . As células foram incubadas na presença ou ausência do Amblyomin-X (1-1000ng/mL) e a intensidade de fluorescência foi monitorada por citometria de fluxo nos tempos 0, 24, 48 ou 72 horas após os tratamentos. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de três ensaios independentes.

Figura 21 Efeito do Amblyomin-X sobre a proliferação de células endoteliais induzida pelo VEGF. Células t-End ($1,25 \times 10^5$ /poço) foram incubadas com CFSE por 45 minutos a 37°C em atmosfera úmida e 5% de CO_2 . As células foram incubadas na presença ou ausência do Amblyomin-X (1-1000ng/mL) e/ou VEGF 50ng/mL e a intensidade de fluorescência foi monitorada por citometria de fluxo nos tempos 0, 24, 48 ou 72 horas após os tratamentos. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de três ensaios independentes. * $p < 0,1$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e #### $p < 0,001$ vs seus respectivos controles.

4.3.4 Efeito do Amblyomin-X sobre o ciclo celular de células endoteliais t-End

Com base nos resultados da proliferação celular apresentados acima, os possíveis efeitos do Amblyomin-X sobre as diferentes etapas do ciclo celular foram investigados por ensaios de citometria de fluxo. Para tanto, células endoteliais foram incubadas com o Amblyomin-X (100ng/mL) por 24, 48 ou 72 horas, na vigência ou ausência de VEGF, e o ciclo celular foi avaliado. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com VEGF aumentou a porcentagem de células em fase S e, além disso, diminuiu a porcentagem de células em fase G1/G0 após 48 e 72 horas de tratamento. O tratamento com Amblyomin-X aumentou o número de células na fase S em todos os períodos de tratamento e os co-tratamentos, Amblyomin-X e VEGF, elevaram a porcentagem de células na fase G1/G0 e reduziram a porcentagem de células em fase S em relação aos valores obtidos em células tratadas somente com o VEGF (Figura 22, Tabela 7).

Figura 22 Efeitos do Amblyomin-X sobre o ciclo celular de células endoteliais. As células t-End foram incubadas com o meio de cultura adicionado de PBS, VEGF (50ng/mL) e/ou Amblyomin-X (100ng/mL) por 24 (A), 48 (B) ou 72 (C) horas, fixadas com metanol e incubadas com PI (2µg/mL). As diferentes etapas do ciclo celular foram identificadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de três ensaios independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs PBS, # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ vs VEGF.

Tabela 7 Efeitos do Amblyomin-X sobre o ciclo celular de células endoteliais

	24h			48h			72h		
	%G0/G1	%S	%G2/M	%G0/G1	%S	%G2/M	%G0/G1	%S	%G2/M
Controle	45±1.3	15.7±2.5	39.3±1.2	67±0.2	17.2±4.4	15.7±4.6	70.6±1	10.2±2.7	19.2±3.7
Amblyomin-X (100ng/mL)	46±4.6	39.2±2*	14.7±2.6*	53±2.7	31.2±3*	15.8±0.3	50±5.3*	41.7±3.2*	8.4±2.1**
VEGF (50ng/mL)	46.5±1.2	35.6±4.8*	17.9±3.6*	45.2±4.1*	39.7±1.3*	18.6±3.6	60.4±1.5*	31.5±2.4*	8.1±0.9**
Amblyomin-X + VEGF	62.3±3.6*	18±2.9#	19.7±0.6**	82.7±2.6*#	10.9±2.1##	6.8±0.0##	80.9±1.4*#	13±0.6#	6±0.7**

As células t-End foram incubadas com o meio de cultura adicionado de PBS, VEGF (50ng/mL) e/ou Amblyomin-X (100ng/mL) por 24, 48 ou 72 horas, fixadas com metanol e incubadas com PI (2µg/mL). As diferentes etapas do ciclo celular foram identificadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de três ensaios independentes. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 vs PBS, #p<0,05 e ##p<0,01 vs VEGF.

4.3.5 Efeitos do Amblyomin-X sobre a aderência celular

Os resultados apresentados na Figura 23 demonstram que o tratamento com Amblyomin-X, na concentração de 100ng/mL, diminuiu a aderência celular em Matrigel® na ausência e na presença de VEGF.

Figura 23 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 PBS (controles), Amblyomin-X (100ng/mL) e/ou VEGF (50ng/mL). A aderência de 5×10^4 células foi permitida por um período de 30 minutos em Matrigel®. As células aderidas foram coradas cristal violeta e os efeitos do tratamento com Amblyomin-X sobre o processo de aderência celular foram mensurados por espectrofotometria (leituras em 580nm e 690nm). Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m de três ensaios independentes. *** $p < 0,001$ vs PBS e ### $p < 0,001$ vs PBS+VEGF.

4.3.6 Efeitos do Amblyomin-X sobre a formação de tubos

Os efeitos do tratamento com o Amblyomin-X sobre a formação de tubos, estimulado ou não pelo fator de crescimento VEGF, foram investigados por ensaios de microscopia ótica. Os ensaios foram conduzidos com células endoteliais tratadas com PBS (controles) ou Amblyomin-X (100ng/mL), na presença ou não do VEGF (50ng/mL) por 24 horas. Os resultados obtidos mostram as células endoteliais, quando confluentes, apresentam-se justapostas e não apresentam formação de estruturas tubulares. O tratamento com Amblyomin-X não reduziu a formação de tubos em relação ao grupo controle. O tratamento com o VEGF aumentou o número estruturas tubulares em relação ao grupo controle e o tratamento com Amblyomin-X diminuiu o número de tubos induzidos pelo fator de crescimento (Figura 24). A Figura 25 apresenta as imagens representativas, obtidas por câmera digital, de células tratadas com PBS (controles), Amblyomin-X, VEGF ou Amblyomin-X adicionado de VEGF.

Figura 24 Efeitos do Amblyomin-X sobre a formação de tubos de células endoteliais em Matrigel®. As células t-End foram incubadas com o meio de cultura adicionado de PBS, VEGF (50ng/mL) e/ou Amblyomin-X (100ng/mL) por 24h sobre uma camada de Matrigel®. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de três ensaios independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs PBS, *** $p < 0,001$ vs VEGF.

Figura 25 Imagens representativas dos efeitos do Amblyomin-X sobre a formação de tubos de células endoteliais em Matrigel®. PBS, VEGF (50ng/mL) e/ou Amblyomin-X (100ng/mL) foram incubadas por 24h em uma camada de Matrigel®. As imagens (aumento de 40x) foram obtidas 24h após a incubação com o auxílio de uma câmera digital acoplada ao microscópio. As setas indicam a formação de tubos pelas células endoteliais.

4.3.7 Efeitos do Amblyomin-X sobre a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais

Os efeitos do tratamento com o Amblyomin-X sobre a expressão das moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas (PECAM-1, VCAM-1 e ICAM-1) e da família das integrinas (β_1 integrina e β_3 integrina) estimuladas ou não pelo fator de crescimento VEGF, foram investigados por ensaios de citometria de fluxo em células endoteliais t-End.

O tratamento com Amblyomin-X não afetou a expressão basal de PECAM-1, VCAM-1 e ICAM-1. O tratamento com VEGF-A aumentou a expressão de todas as moléculas de adesão avaliadas e o tratamento concomitante de Amblyomin-X e VEGF inibiu o aumento da expressão causada pelo fator de crescimento (Figura 26 A, B e C).

Os tratamentos com Amblyomin-X, VEGF e a associação de ambos não alteraram a expressão basal de β_1 integrina na membrana das células endoteliais (Figura 27 A).

O tratamento com o Amblyomin-X não alterou a expressão basal da β_3 integrina. No entanto, a tratamento com VEGF aumentou a expressão desta molécula na membrana celular, a qual não foi revertida pelo tratamento concomitante com Amblyomin-X (Figura 27 B).

Figura 26 Efeitos do Amblyomin-X sobre a expressão de moléculas de adesão, da superfamília das imunoglobulinas em células endoteliais. As células foram mantidas em cultura, plaqueadas e pós a aderência celular, foram incubadas com o meio de cultura adicionado de PBS, VEGF (10ng/mL) e/ou Amblyomin-X (100ng/mL) por 8 horas. A expressão de PECAM-1 (A), VCAM-1 (B) e ICAM-1 (C) foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de três ensaios independentes. * $p < 0,05$ vs PBS, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs VEGF.

Figura 27 Efeitos do Amblyomin-X sobre a expressão de moléculas de adesão, da família das integrinas em células endoteliais. As células foram mantidas em cultura, plaqueadas e pós a aderência celular, foram incubadas com o meio de cultura adicionado de PBS, VEGF (10ng/mL) e/ou Amblyomin-X (100ng/mL) por 8 horas. A expressão de β_1 integrina (A) e β_3 integrina (B) foi avaliada por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de três ensaios independentes. * $p < 0,05$ vs PBS.

4.3.8 Efeitos do Amblyomin-X sobre a expressão gênica da PECAM-1, VCAM-1 e ICAM-1 em células endoteliais

Para avaliar se as reduções da expressão protéica da PECAM-1, VCAM-1 e ICAM-1 em células endoteliais eram dependentes de alterações na síntese das moléculas, os níveis de RNAm destas moléculas foram quantificados por ensaios de TR-PCR .

O tratamento com VEGF aumentou a expressão gênica de PECAM-1 e ICAM-1, e estas não foram inibidas pelo tratamento com Amblyomin-X (Figura 28 A e 30 A). Por outro lado, o tratamento com VEGF ou com Amblyomin-X não alteraram a expressão gênica de VCAM-1 (Figura 29 A). As Figuras 28 B, 29 B e 30 B mostram uma imagem representativa da eletroforese em gel de agarose para RNAm da PECAM-1, VCAM-1 e da ICAM-1, respectivamente.

Figura 28 Efeito do tratamento com Amblyomin-X sobre a expressão gênica da PECAM-1 induzida pelo VEGF em células endoteliais. As células endoteliais t-End foram tratadas com PBS (controles), VEGF (10ng/mL) e/ou Amblyomin-X (100ng/mL) por 2 horas e empregadas na extração do RNA^m com reagente Trizol®. A reação de PCR foi realizada com *primer* específico para PECAM-1. Os resultados são expressos como média±e.p.m. obtido de três ensaios independentes (A) e (B) é uma imagem representativa da eletroforese em gel de agarose.

Figura 29 Efeito do tratamento com Amblyomin-X sobre a expressão gênica da VCAM-1 induzida pelo VEGF em células endoteliais. As células endoteliais t-End foram tratadas com PBS (controles), VEGF (10ng/mL) e/ou Amblyomin-X (100ng/mL) por 2 horas e empregadas na extração do RNAm com reagente Trizol®. A reação de PCR foi realizada com *primer* específico para VCAM-1. Os resultados são expressos como média±e.p.m. obtido de três ensaios independentes (A) e (B) é uma imagem representativa da eletroforese em gel de agarose.

Figura 30 Efeito do tratamento com Amblyomin-X sobre a expressão gênica da ICAM-1 induzida pelo VEGF em células endoteliais. As células endoteliais t-End foram tratadas com PBS (controles), VEGF (10ng/mL) e/ou Amblyomin-X (100ng/mL) por 2 horas e empregadas na extração do RNAm com reagente Trizol®. A reação de PCR foi realizada com *primer* específico para ICAM-1. Os resultados são expressos como média±e.p.m. obtido de três ensaios independentes (A) e (B) é uma imagem representativa da eletroforese em gel de agarose.

5. DISCUSSÃO

Os dados obtidos, até o momento, mostram que a aplicação tópica de Amblyomin-X inibe a formação de novos vasos induzidos pelo VEGF *in vivo* e sugere que este efeito pode ser dependente, pelo menos em parte, da ação desta toxina sobre a proliferação, adesão, tubulogênese e expressão de moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas em células endoteliais.

Como já salientado na Introdução, os dados que conduziram a este projeto foram as observações preliminares do grupo de pesquisa do Instituto Butantan, coordenado pela Dra. Ana Marisa Chudzinski-Tavassi, que demonstrou, recentemente, que a aplicação sistêmica e por tempo prolongado de Amblyomin-X reduz a formação de tumor em camundongos, causando até mesmo a regressão do mesmo (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.*, 2010). Ainda, o mesmo grupo verificou decréscimo do número de vasos próximos à área de crescimento tumoral, sugerindo que o Amblyomin-X pudesse ter ação sobre a angiogênese. Esta última ação pode ser pertinente, uma vez que a literatura mostra a ação de inibidores de serinoproteases sobre este processo (BINDER *et al.*, 2007; ROEMISCH *et al.*, 2002). Corroborando esta hipótese, trabalho concomitante a este, que vem sendo realizado em nosso Laboratório, tem mostrado que a inibição causada pela aplicação tópica do Amblyomin-X sobre a massa tumoral induzida pela linhagem de melanoma B16F10 em camundongos pode ser decorrente, pelo menos em parte, da inibição da formação de novos vasos, comprometendo a irrigação do tumor (Rodrigo Dias, comunicação pessoal). Neste presente trabalho a mesma metodologia foi empregada, ou seja, a câmara dorsal em camundongos, para se aquilatar a influência do Amblyomin-X sobre a formação de novos vasos induzida pelo VEGF-A *in vivo* e os dados obtidos mostraram que o efeito modulador do Amblyomin-X sobre o processo. Adicionalmente, a ação da toxina foi corroborada no modelo de angiogênese em membrana corioalantóica.

O modelo experimental da câmara dorsal em camundongos permite avaliar a cinética de crescimento dos novos vasos. Esta metodologia tem sido amplamente empregada para o estudo de novas moléculas com papel na

angiogênese, uma vez que pode ser realizada em mamíferos, além das imagens da microcirculação poderem ser comparadas, quantitativamente, antes e após os tratamentos. Estas características conferem vantagens sobre as demais técnicas *in vivo* utilizadas para tal fim (HARDER *et al.*, 2004, STATON *et al.*, 2009). No entanto, é importante salientar que a manipulação cirúrgica para implantação da câmara causa inflamação de pequena intensidade, visualizada por alguns pontos de edema e de hemorragia, que diminui após o terceiro dia de implantação. Esta foi a razão pela qual os tratamentos tiveram início após este período. Diferentemente, o modelo de angiogênese em membrana corioalantóica possui outras vantagens, por ser uma técnica minimamente invasiva, além de múltiplos sítios de testes poderem ser aplicados na mesma membrana (RIBATTI, 2008; STATON *et al.*, 2009).

Os resultados aqui demonstrados revelaram que os tratamentos *in vivo* com Amblyomin-X, quando iniciados anteriormente ou concomitantemente ao VEGF, inibiram a formação de novos vasos em camundongos e na membrana corioalantóica. Diferentemente, quando o tratamento foi iniciado posteriormente à aplicação do fator de crescimento, este efeito não foi observado, ou seja, a angiogênese não foi inibida. A explicação para este último efeito não está estabelecida, mas é possível supor que uma vez iniciado o processo de angiogênese, a concentração de Amblyomin-X empregada não seja suficiente para inibir toda a cascata de eventos intracelulares do processo ou a toxina não seja específica para atuar sobre outros fatores endógenos, que atuam por inúmeras vias, liberados durante a angiogênese.

Apesar de estar descrito que o Amblyomin-X possui similaridades aos inibidores de serinoproteases do tipo kunitz, seu mecanismo de interação com as serinoproteases ainda não está descrito. A literatura, como descrita na Introdução, mostra que estes inibidores podem interagir de maneira reversível ou irreversível com diferentes sítios das proteases (KROWARSCH *et al.*, 2003; OTLEWSKI *et al.*, 2005). Independente do seu mecanismo de inibição enzimática, sabe-se, até o momento, que o Amblyomin-X inibe o Fator Xa da coagulação, promove ação citotóxica em células tumorais (linhagens de células de melanoma humano e de adenocarcinoma pancreático) *in vitro*, diminui a massa tumoral e metástases induzidas por células B16F10 (BATISTA *et al.*, 2008; CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.*, 2010). O efeito citotóxico sobre as células

tumorais parecem ser dependente, pelo menos em parte, da diminuição da atividade proteassomal, do aumento da expressão do gene da subunidade catalítica β_2 do proteassoma e da diminuição do *pool* de proteínas poli-ubiquitinadas, observados em ambas as linhagens tumorais estudadas (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.*, 2010) .

Tem sido proposto que inibidores de serinoproteases, inibem a formação de novos vasos, especialmente, em áreas tumorais, por diferentes mecanismos, a saber: 1) inibição da proliferação da célula endotelial; 2) inibição da migração da célula edotelial; 3) inibição da tubulogênese; 4) indução da apoptose da célula endotelial (ANDREASEN *et al.*, 2000; BALSARA & PLOPLIS, 2008; CHAO *et al.*, 2001; CORVOL *et al.*, 2003; ISLAM *et al.*, 2009; KONDRAGANTI *et al.*, 2006; SHAKIBA *et al.*, 2007; STEPHENS *et al.*, 1998); 5) inibição da ação de metaloproteases de matriz extravascular; 6) inibição da ativação da cascata da coagulação (IVANCIU *et al.*, 2007; STATHAKIS *et al.*, 1999; TORRES-COLLADO *et al.*, 2006) e 7) por atuar sobre a expressão/ativação ou interação de moléculas de adesão endoteliais da família das integrinas, que medeiam a interação entre as células endoteliais e componentes da matriz extravascular (LOSKUTOFF *et al.*, 1999; STEFANSSON *et al.*, 1996). Apesar da literatura sobre a ação de inibidores de proteases sobre a angiogênese ser bem estabelecida, a ação de enzimas do tipo kunitz ainda é fragmentária. Foi observado que o TFPI-2 induz a apoptose e inibe a adesão, migração de células endoteliais, além da formação de tubos e a inibição de MMP de matriz (CHAND *et al.*, 2005; IVANCIU *et al.*, 2007; PROVENÇAL *et al.*, 2008; SIERKO *et al.*, 2007; TORRES-CALADO *et al.*, 2006), sendo que os efeitos sobre a adesão celular são dependentes da inibição da via ERK, reduzindo a fosforilação de quinases de adesão focal e paxilina (PROVENÇAL *et al.*, 2008). Com base nos dados da ação do Amblyomin-X, descritas até o momento, e dos dados da literatura sobre os inibidores de serinoproteases do tipo kunitz, o passo subsequente deste trabalho foi avaliar a ação do Amblyomin-X sobre a apoptose, a proliferação da célula endotelial, a tubulogênese *in vitro*, a aderência e a expressão de moléculas de adesão em sua superfície. Assim, os estudos passaram a ser realizados com as células endoteliais t-End. Estas células são provenientes da microcirculação de hemangioma de timo de camundongos (WILLIAMS *et al.*,

1988). Estas expressam o antígeno do fleuma vírus T, possuem projeções morfológicas características de células endoteliais, causam hemangiomas *in vivo*, têm alta atividade fibrinolítica quando comparadas com células endoteliais normais e expressam o Fator de von Willebrand (BUSSOLINO *et al.*, 1991). Esta foi a linhagem de escolha deste trabalho, visto a relevância das características fenotípicas e funcionais das células endoteliais de microcirculação para os eventos relacionados à angiogênese, além de manter os estudos *in vivo* e *in vitro* em células de uma mesma espécie animal.

A ação tóxica do Amblyomin-X sobre as células t-End foi excluída pela observação da manutenção da viabilidade celular em ensaios que mensuraram a apoptose e necrose. Desta forma, estes dados asseguraram que os resultados obtidos nos estudos subseqüentes não seriam decorrentes de morte celular. Esta possibilidade poderia ter sido sugerida, uma vez que o Amblyomin-X causou apoptose em diversas linhagens celulares tumorais, sendo que os mecanismos associados foram a diminuição da atividade proteassomal e a alteração do sistema ubiquitinina/proteasoma (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.*, 2010) e que um dos mecanismos propostos para a ação de inibidores de serinoprotease do tipo Kunitz sobre a angiogênese é a indução da apoptose (CHAND *et al.*, 2005; SIERKO *et al.*, 2007).

O processo de morte celular pode ocorrer por diferentes mecanismos (KROEMER *et al.*, 2009). Na célula endotelial, a necrose, apoptose e os anóiques (MELINO *et al.*, 2005) são os mais estudados e seus mecanismos estão bem estabelecidos para estas células. No processo inicial de apoptose, as células exteriorizam a fosfatidilserina, antes que a integridade da membrana plasmática seja comprometida (CARMONA-GUTIERREZ *et al.*, 2010; MELINO *et al.*, 2005). A exposição da fosfatidilserina serve como um gatilho para o reconhecimento de células apoptóticas por macrófagos (ELMORE, 2007; POON *et al.*, 2010), promovendo, assim, a eliminação destas células sem a ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo citoplasmático (ELMORE, 2007). Esta externalização é mensurada pela marcação celular com anexina V, que liga-se a fosfolipídios, como a fosfatidilserina, de uma maneira reversível e cálcio-dependente (MELINO *et al.*, 2005). Já no processo de necrose, há rompimento da membrana plasmática e liberação do conteúdo intracelular (POON *et al.*, 2010). A mensuração deste tipo de morte celular

pode ser feita pela incubação com iodeto de propídio, um corante impermeável à membrana celular íntegra, que tem afinidade por estruturas intracelulares, como o DNA (ELMORE, 2007; WILLINGHAM *et al.*, 1999). Entre a apoptose e a necrose, há uma fase no processo de morte celular denominada de apoptose tardia, que é caracterizada pela externalização da fosfatidilserina e rompimento da membrana plasmática. Assim, nesta fase, as células são marcadas tanto para o iodeto de propídio, como para anexina V (ELMORE, 2007).

Com o intuito de se investigar se o Amblyomin-X poderia afetar os passos envolvidos na morte celular pela apoptose e necrose, a estratégia experimental foi induzir a morte celular por meio carenciado e avaliar cada etapa do processo por citometria de fluxo. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram uma possível ação protetora do Amblyomin-X sobre a apoptose, em especial sobre a apoptose tardia. Como já salientado, os mecanismos de ação do Amblyomin-X não estão totalmente esclarecidos e a literatura sobre a ação citoprotetora de inibidores de serinoproteases ainda é controversa (ANSARI *et al.*, 2010; BAJOU *et al.*, 2008; WAISMAN *et al.*, 2009). Desta forma, uma série de hipóteses pode ser levantada para explicar a ação do Amblyomin-X sobre a inibição da apoptose e da apoptose tardia, incluindo a interação com as vias de sinalização intrínsecas do processo, como por exemplo, ativação das proteínas Bcl-2, inativação das Bax/Bak, alteração da conversão das pró-formas das caspases (caspase 9 e caspases 3, 5 e 7) (DUPREZ *et al.*, 2009). Esta hipótese deverá ser investigada no futuro, pela caracterização da ação do Amblyomin-x sobre as vias intracelulares envolvidas na apoptose.

No processo de angiogênese, a sinalização emitida pelas *tip cells* favorece a proliferação de *stalk cells* para o processo de tubulogênese e para formação do novo vaso (GERHARDT *et al.*, 2003; RUHRBERG *et al.*, 2002). Nesta condição, a multiplicação celular é controlada pelos mediadores do processo, entre os quais os VEGFs (GERHARDT *et al.*, 2003; KARAMYSHEVA, 2008). A interação do VEGF com seus receptores induz a dimerização dos mesmos, resultando na ativação de diferentes vias de sinalização intracelular. Assim, a fosforilação de resíduos tirosina conduz à ativação da transdução de diversos sinais, como por exemplo, da PLC γ , que desencadeia a liberação de cálcio e ativação da PKC e essa, por sua vez, estimula as vias Raf/MAPK/quinase, desencadeando a proliferação celular.

Além disso, a sinalização mediada pelo PI3K leva a ativação da Akt/PKB, que promove a sobrevivência celular, permeabilidade vascular e migração celular. Adicionalmente, a sinalização mediada pelas Src promove a migração celular e permeabilidade vascular e as MAPK levam a migração celular, permeabilidade vascular e remodelamento da actina (ELICEIRI *et al.*, 1999; OLSSON *et al.*, 2006; RINI & SMALL, 2005; ROBERTS *et al.*, 2009).

Com base nos dados mostrados previamente, obtidos nos estudos *in vivo*, uma das hipóteses para esclarecer o mecanismo de ação do Amblyomin-X seria a interferência sobre o processo de sinalização mediado pelo VEGF-A e seus receptores. De fato, os dados aqui obtidos confirmam a ação inibitória do Amblyomin-X sobre a proliferação das células t-End na vigência de estimulação pelo VEGF-A e corroboram dados da literatura, uma vez que a literatura descreve que o tratamento de células endoteliais com inibidores de serinoproteases diminui a taxa proliferativa destas células (CHOROSTOWSKA-WYNIMKO *et al.*, 2010; SU *et al.*, 2010). É importante salientar que a metodologia aqui empregada para avaliação da proliferação celular, que consistiu na incorporação de um marcador intracelular e que é herdado pelas células filhas, possui vantagens sobre as demais descritas na literatura para tal fim, uma vez que permite avaliar quantitativamente a cinética de proliferação, além de poder-se definir o número de divisões celulares (LYONS, 2000).

As alterações da proliferação celular estão vinculadas à modificações no ciclo celular. De maneira geral, a divisão de uma célula eucariótica ocorre em quatro fases distintas: G1, S, G2 e M. Na fase G1 (*gap 1*) a célula é preparada para a replicação do DNA, quando a célula integra os sinais mitogênicos e inibitórios para, então, continuar, parar ou sair do ciclo celular. A fase S (fase de síntese) é a única fase onde ocorre duplicação do DNA. A fase G2 (*gap 2*) permite a preparação para a fase M (mitose) ocorra, quando então, há segregação dos cromossomos e citocinese. Já na fase M, os cromossomos duplicados se separam e são geradas duas novas células a partir da célula mãe.

Os resultados obtidos mostram que o tratamento com Amblyomin-X, concomitante ao VEGF-A, induziu parada na progressão do ciclo celular na fase G1/G0 e na fase S. Estes dados permitem inferir que o Amblyomin-X afete a via de sinalização do VEGF-A ou as proteínas/inibidores responsáveis pela

progressão do ciclo celular. Adicionalmente, verificamos que o Amblyomin-X, na presença de VEGF-A, não alterou a percentagem de células em G2/M. Confirmando a ausência de efeito do Amblyomin-X sobre esta fase do ciclo celular, verificamos que o Amblyomin-X não causa fragmentação nuclear (dados não mostrados).

O ciclo celular é controlado em diversos pontos por complexos ciclinas/CDKs (quinases dependentes de ciclina) (SHERR, 1996; SHERR & ROBERTS, 2004). Os estímulos mitogênico e o acúmulo de ciclinas D, que se ligam e ativam as CDKs 4 e 6, que são importantes indutores da fase inicial G1 do ciclo celular (BALK & KNUDSEN, 2008). Durante o decorrer do ciclo celular existe a atuação de inibidores desses complexos, como por exemplo, as proteínas p21 e p27, que podem impedir a progressão do ciclo celular (GRANA & REDDY, 1995; TAKAHASHI *et al.*, 2009). A proteína p53 funciona como um fator de transcrição que pode induzir o aumento de p21 quando há, por exemplo, dano no DNA (PARK *et al.*, 2006). Com base nestes mecanismos de controle do ciclo e nos resultados obtidos, pode-se inferir o papel do Amblyomin-X nestes processos. Interessantemente, o tratamento com o Amblyomin-X, na ausência de VEGF-A, demonstrou um efeito semelhante ao do fator de crescimento no ciclo celular, mas não afetou a proliferação celular. Estes resultados são instigantes e sugerem ações próprias do Amblyomin-X que diferem na vigência de estimulação celular. Os possíveis mecanismos envolvidos nestes efeitos serão avaliados posteriormente.

Associados, os resultados apresentados, até então, sugerem a interferência do Amblyomin-X sobre os mecanismos de sobrevivência e de replicação da célula endotelial evocados pelo VEGF-A, que podem ser relevantes para a angiogênese *in vivo*. Se por um lado o Amblyomin-X não causa morte das células endoteliais e as protege da apoptose evocada por carenciação de soro, sendo que estes processos poderiam favorecer a angiogênese, por outro lado, o Amblyomin-X inibe a expansão numérica destas células, que, indubitavelmente, compromete a formação de novos vasos.

Como a literatura mostra que os inibidores de serinoproteases do tipo kunitz afetam as etapas de migração e adesão à matriz extravascular e a interação entre as células endoteliais (CHAND *et al.*, 2005; IVANCIU *et al.*, 2007; PROVENÇAL *et al.*, 2008; SIERKO *et al.*, 2007; TORRES-CALADO *et al.*,

2006), a ação do Amblyomin-X passou a ser investigada sobre estes parâmetros. Neste contexto, vale ressaltar que trabalho concomitante a este, demonstrou que o Amblyomin-X, *per se*, com concentrações semelhantes às utilizadas neste trabalho, interfere com o processo de migração das células endoteliais, mas não com aquela induzida pelo VEGF-A (Rodrigo Dias, Comunicação Pessoal).

O efeito do Amblyomin-X sobre a aderência das células endoteliais foi investigado empregando-se Matrigel®, que mimetiza a composição da matriz extracelular. Os dados obtidos demonstraram que o tratamento com Amblyomin-X (100ng/mL) diminui a adesão das células endoteliais neste substrato, tanto na ausência de estímulo, quanto na presença de VEGF-A. A adesão das células endoteliais no desenvolvimento da angiogênese permite a interação com a matriz extravascular e interação célula-célula, levando à formação de estruturas tubulares, fundamentais para a formação dos vasos sanguíneos nas fases finais do processo da angiogênese (FRANCAVILLA *et al.*, 2009; PAN *et al.*, 2010). O tratamento com o Amblyomin-X inibiu a formação de tubos, sobre o Matrigel®, somente na presença de VEGF-A. No ensaio de formação de tubos *in vitro* pode-se avaliar, em última instância, a capacidade das células endoteliais em degradar a matriz extravascular, migrar nesta matriz, se organizar e se unir em formas tubulares, sendo que este último processo está estritamente relacionado à expressão de moléculas expressas nas junções interendoteliais.

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, que medeiam e sinalizam os processos de migração, proliferação e sobrevivência celular (FRANCAVILLA *et al.*, 2009; RAMJAUN & HODIVALA-DILKE, 2009). Dados da literatura demonstram que inibidores de serinoproteases afetam a expressão/ativação de moléculas de adesão da família das integrinas, responsáveis pelas interações célula-matriz (LOSKUTOFF *et al.*, 1999; STEFANSSON *et al.*, 1996; UNDERWOOD *et al.*, 2001). No entanto, os dados da ação de inibidores do tipo Kunitz na expressão de moléculas de adesão ainda são escassos. Neste trabalho demonstramos que o tratamento com o Amblyomin-X inibiu a adesão

celular e a formação de tubos de células endoteliais, o que pode sugerir que o Amblyomin-X possa afetar a expressão de moléculas de adesão envolvidas com a ligação da célula endotelial ao substrato.

O tratamento com Amblyomin-X não afetou a expressão das β_1 e β_3 integrinas, o que foi surpreendente, uma vez que a literatura sugere que inibidores de serinoproteases afetam a expressão/atividade das integrinas (NOEL *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 2010)e, ainda observamos que o inibidor de serinoproteases inibiu a adesão da célula endotelial à matriz. Este efeito pode não ter sido observado por características próprias da células t-End ou pelo protocolo experimental utilizado. Desta forma, ainda não é possível, concluir com certeza se o Amblyomin-X possui ou não ação sobre a expressão de moléculas de adesão das subfamílias β_1 e β_3 das integrinas. Análise subsequente será realizada em cultura de células endotelial humana, onde a expressão de β_1 e β_3 são expressas após estimulação pelo VEGF-A (MAHABELESHWAR *et al.*, 2007; GANAPATI *et al.*, 2008; SOLDI *et al.*, 1999).

No entanto, o Amblyomin-X reverteu o aumento da expressão de PECAM-1, VCAM-1 e ICAM-1 nas membranas das células t-End causada pelo VEGF-A. Interessantemente, o efeito inibitório sobre a ICAM-1 e PECAM-1 não são dependentes do controle da expressão gênica, uma vez que os níveis de RNAm para as duas moléculas de adesão não foram alterados. Não é possível concluir o mecanismo de ação do Amblyomin-X sobre a expressão de VCAM-1, já que o VEGF-A não alterou os níveis de RNAm. Estudos subsequentes são necessários para se aquilatar a ação do Amblyomin-X sobre a VCAM-1.

O significado biológico da ação do Amblyomin-X sobre as moléculas da superfamília das imunoglobulinas pode ser muito complexo, uma vez que além de mediar as adesões nas junções entre as células endoteliais, estas também estão envolvidas na sinalização intracelular de várias etapas importantes na angiogênese. Os dados aqui demonstrados evidenciam que o efeito antiangiogênico do Amblyomin-X pode ser dependente, pelo menos em parte, da inibição da expressão endotelial de PECAM-1 e ICAM-1. Embora a participação de ICAM-1 têm sido relacionado a adesão e migração de células endoteliais e que animais ICAM-1^(-/-) apresentam prejuízo no processo de

angiogênese (KEVIL *et al.*, 2004; LANGSTON *et al.*, 2007), as evidências contundentes indicam a relevância do papel da PECAM-1 no processo de angiogênese (CARREAU *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2010). A PECAM-1 é composta por 6 domínios semelhantes a Ig e é expressa nas bordas das células endoteliais onde participa das interações da matrix extravascular-células endoteliais-leucócitos (WOODFIN *et al.*, 2007). Experimentos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que a administração de anticorpos monoclonais anti-PECAM-1 em ratos ou camundongos inibe a neovascularização induzida por fatores de crescimento, quimiocinas ou células tumorais (DELISSER *et al.*, 1997; ZHOU *et al.*, 1999) e, além disso, camundongos deficientes de PECAM-1 apresentam prejuízos na formação de novos vasos (PARK *et al.*, 2010; DIMAIO & SHEIBANI, 2008). O mecanismo de PECAM-1 está relacionado com a sinalização “*outside-in*” nas junções celulares que medeiam a proliferação, adesão, migração e formação de tubos (CAO *et al.*, 2002; KONDO *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2010; SHARMA *et al.*, 2010; DIMAIO & SHEIBANI, 2008). As ações específicas da PECAM-1 no processo depende do tamanho e da inserção dos domínios de Ig no citoplasma (KONDO *et al.*, 2007; PRIVRATSKY *et al.*, 2010; DIMAIO & SHEIBANI, 2008). Ainda, dados recentes têm mostrado o papel da PECAM-1 na carcinogênese, uma vez que a PECAM-1 expressa na célula endotelial medeia a proliferação de células cancerosas e suas ligações aos vasos da rede microvascular, tanto no processo precoce, como adiantado de metástases e leucemias (DELISSER *et al.*, 2010; POGGI *et al.*, 2010; TASKINEN *et al.*, 2010). Assim, é possível que a ação do Amblyomin-X sobre a PECAM-1 possa ser um dos mecanismos envolvidos na ação anti-tumoral do Amblyomin-X, já previamente descrita.

O pool de imunoglobulinas de membrana PECAM-1 e ICAM-1 depende da expressão gênica, internalização e clivagem enzimática (JACKSON, 2003). Aqui nós mostramos que o Amblyomin-X não afeta o mRNA da PECAM-1 e da ICAM-1, sugerido que o controle pode ser exercido no processo de internalização celular ou nos processos de clivagem na membrana, contudo, estas hipóteses devem ser investigadas.

Associados, os dados aqui obtidos mostram o papel do Amblyomin-X sobre as vias de sinalização do VEGF-A, interferindo na proliferação celular, adesão celular e formação de tubos de células endoteliais. A possibilidade dos

efeitos serem decorrentes de ações diretas do Amblyomin-X ou dependentes da ação sobre a expressão de moléculas de adesão das superfamília das imunoglobulinas precisa ser investigado. Independente do mecanismo envolvido, este trabalho mostra claramente que o Amblyomin-X inibe a angiogênese *in vivo* induzido pelo VEGF-A e que as ações sobre a célula endotelial podem ser relevantes para esta ação biológica do Amblyomin-X.

Em conjunto, os resultados apresentados neste trabalho, até o momento, mostram que o Amblyomin-X é uma molécula promissora por suas ações anti-angiogênicas e que outras ações relevantes, ainda não estudadas, em especial as mediadas pelas moléculas de adesão, podem fornecer subsídios ainda maiores para o possível emprego terapêutico deste inibidor de serinoprotease.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, nas condições experimentais propostas, permitem concluir que o tratamento com o Amblyomin-X:

- 1) tópico e *in vivo*, quando iniciado anterior ou concomitantemente com a estimulação pelo VEGF-A, inibe a angiogênese no tecido subcutâneo dorsal de camundongos; efeito não detectado quando o tratamento com Amblyomin-X é iniciado posteriormente ao tratamento com VEGF-A;
- 2) inibe a angiogênese induzida pelo VEGF-A em membrana corioalantóica;
- 3) não induz morte de células t-End;
- 4) protege as células t-End da apoptose e da apoptose tardia causadas pelo meio carenciado;
- 5) inibe a proliferação de células t-End na presença de VEGF-A;
- 6) promove parada no ciclo celular nas fases G1/G0 na presença de VEGF-A;
- 7) inibe a adesão de células t-End tanto na presença quanto na ausência de VEGF-A;
- 8) inibe a formação de tubos somente na presença de VEGF-A;
- 9) inibe a expressão da PECAM-1, VCAM-1 e ICAM-1 induzido pelo VEGF-A em células endoteliais e não altera a expressão das β_1 e β_3 integrinas nestas condições experimentais;
- 10) não altera a expressão gênica das moléculas de adesão PECAM-1, VCAM-1 e ICAM-1.

Associados, estas conclusões mostram que o Amblyomin-X afeta a formação de novos vasos *in vivo* induzidos pelo VEGF-A. Suas ações sobre a proliferação, adesão, migração, formação de tubos e expressão de moléculas de adesão das células endoteliais podem estar envolvidas neste efeito.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFARA, N.I., ANDREU, P., COUSSENS, L.M. Delineating protease functions during cancer development. *Methods Mol Biol*, v. 539, p. 1-32, 2009.

ALBELDA, S.M., MULLER, W.A., BUCK, C.A., NEWMAN, P.J. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): A novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*, v. 114, p. 1059-68, 1991.

ALBELDA, S.M., OLIVER, P.D. EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*, v. 110, n. 4, p.1227-37, 1990.

ANDREASEN, P.A., EGELUND, R., PETERSEN, H.H. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci.*, v. 57, n. 1, p. 25-40, 2000.

ANSARI, A.W., TEMBLAY, J.N., ALYAHYA, S.H., ASHTON-RICKARDT, P.G. Serine protease inhibitor 6 protects iNKT cells from self-inflicted damage. *J Immunol.*, v. 158, n. 2, p. 877-83, 2010.

ARROYO, A.G., IRUELA-ARISPE, M.L. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovasc Res*, v. 86, n. 2, p. 226-35, 2010.

AUZZAS, L., ZANARDI, F., BATTISTINI, L., BURREDDU, P., CARTA, P., RASSU, G., CURTI, C., CASIRAGHI, G. Targeting alphavbeta3 integrin: desing and applications of mono-and multifunctional RDG-based peptides and semipeptides. *Curr. Med. Chem.*, v. 17, p. 1255-99, 2010.

AVRAAMIDES, C.J., GARMY-SUSINI, B., VARNER, J.A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer.*, v. 8, n. 8, p. 604-17, 2008.

AZUMA, M. Expression of integrins subunits in normal and malignant human salivary giant cell clones and its regulation by trans-forming growth factor – β 1. *Cancer Lettres*, v. 109, p. 91-99, 1996.

BAJOU, K., PENG, H., LAUG, W.E., MAILLARD, C., NOEL, A., FOIDART, J.M., MARTIAL, J.A., DECLERCK, Y.A. Plasminogen activator inhibitor-1 protects endothelial cells from FasL-mediated apoptosis. *Cancer Cell.*, v. 14, p. 324-34, 2008.

BALK, S.P., KNUDESN, K.E. The cell cycle and prostate cancer. *Nucl Recept Signal*, v.6, p.1-12, 2008.

BALSARA, R.D., PLOPLIS, V.A. Plasminogen activator inhibitor-1: The Double-edged sword in apoptosis. *Thromb Haemost.*, v. 100, n. 6, p. 1029-36, 2008.

BARCZYK, M., CARRACEDO, S., GULLBERG, D. INTEGRINS. *Cell Tissue Res.*, v. 339, n. 1, p. 269-80, 2010.

BARR, P., FISHER, R., FRIEDBERG, J. The role of bortezomib in the treatment of lymphoma. *Cancer Invest.*, v. 25, n. 8, p. 766-75, 2007.

BATISTA, I.F., CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M., FARIA, F., SIMONS, S.M., BARROS-BATESTTI, D.M., LABRUNA, M.B., LEÃO, L.I., HO, P.L., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO,

I.L. Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Toxicon*, v. 51, n. 5, p. 823-34, 2008.

BATISTA, I.F., RAMOS, O.H., VENTURA, J.S., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L., HO, P.L., CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. A new Factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 493, p. 151-6, 2009.

BERGERS, B., BENJAMIN, L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev cancer*, v. 6, p. 401-10, 2003.

BERTINI, I, FRAGAI, M., LUCHINAT, C. Intra- and interdomain flexibility in matrix metalloproteinases: functional aspects and drug design. *Curr Pharm Des*, v. 15, p. 3592-3605, 2009.

BINDER, B.R., MIHALY, J., PRAGER, G.W. uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view. *Thromb Haemost.*, v. 97, n. 3, p. 336-42, 2007.

BLOCH, W., FORSBERG, E., LENTINI, S., BRAKEBUSCH, C., MARTIN, K., KRELL, H.W., WEIDLE, U.H., ADDICKS, K., FÄSSLER, R. Beta 1 integrin is essential for teratoma growth and angiogenesis. *J Cell Biol.*, v. 139, n. 1, p. 265-78, 1997.

BOCHENER, B.S., LUSCINSKAS, F.W., , NEWMAN, W., STERBINSKY, S.A., DERSE-ANTHONY, C.P., KLUNK, D., SCHLEIMER, R.P. Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med.*, v. 173, n. 6, p. 1553-7, 1991.

BROOK, E., HERBERT, A.P., JENKINS, H.T., SOARES, D.C., BARLOW, P.N. Opportunities for new therapies based on the natural regulators of complement activation. *Ann N Y Acad Sci.*, v. 1056, p. 176-88, 2005.

BROOKS, P.C., CLARK, R.A. CHERESH, D.A. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science*, v. 264, n. 5158, p. 569-71, 1994.

BUSSOLINO, F., DE ROSSI, M., SICA, A., COLOTTA, F. WANG, J.M., BOCCHIETTO, E., PADURA, I.M., BOSSIA, A., DEJANA, E., MANTOVANI, A. Murine endothelial cell lines transformed by polyoma middle T oncogene as target for and producers of cytokines. *The Journ of Immun.*, v. 147, p. 2122-29, 1991.

BUTTLE, D.J. Factors controlling matrix turnover in health and disease. *Biochem Soc Trans*, v. 35, p. 643-46, 2007.

CAO, G.; O'BRIEN, C.D.; ZHOU, Z.; SANDERS, S.M.; GREENBAUM, J.N.; MAKRIGIANNAKIS, A.; DELISSER, H.M. Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 282, n. 5, p. C1181-90, 2002.

CARREAU, A.; KIEDA, C.; GRILLON, C. Nitric oxide modulates the expression of endothelial cell adhesion molecules involved in angiogenesis and leukocyte recruitment, *Exp Cell Res*, v. 317, n. 1, p. 29-41, 2010.

CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.*, v. 6, n. 4, p. 389-95, 2000.

CARMELIET, P., JAIN, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, v. 407, p. 249-57, 2000.

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. 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*, v. 811, p. 191-206, 1997.

CARMONA-GUTIERREZ, D., EISENBERG, T., BÜTTNER, B.; MEISINGER, C., KROEMER, G., MADEO, F. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death and Differentiation*, p. 1-11, 2010.

CHAND, H.S., FOSTER, D.C., KISIEL, W. Structure, function and biology of tissue factor pathway inhibitor-2. *Thromb Haemost*, v. 94, p. 1122-30, 2005.

CHAND, H.S., SCHMIDT, A.E., BAJAJ, S.P., KISIEL, W. Structure-function analysis of the reactive site in the first Kunitz-type domain of human tissue factor pathway inhibitor-2. *J Biol Chem*, v. 279, p. 17500-07, 2004.

CHAO, J., MIAO, R.Q., CHEN, V., CHEN, L.M., CHAO, L. Novel roles of kallistatin, a specific tissue kallikrein inhibitor, in vascular remodeling. *Biol Chem.*, v. 382, n. 1, p. 15-21, 2001.

CHEN, Q., MANNING, C.D., MILLAR, H., MCCABE, F.L., FERRANTE, C., SHARP, C., SHAHIED-ARRUDA, L., DOSHI, P., NAKADA, M.T., ANDERSON, G.M. CNTO 95, a fully human anti alphav integrin antibody, inhibits cell signaling, migration, invasion, and spontaneous metastasis of human breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis.*, v. 25, n. 5, p. 139-48, 2008.

CHOROSTOWSKA-WYNIMKO, J., KEDZIOR, M., STRUNIAWSKI, R., JAGUŚ, P., SKRZYPCZAK-JANKUN, E., JANKUN, J. Cell phenotype determines PAI-1 antiproliferative effect - suppressed proliferation of the lung cancer but not prostate cancer cells. *Pneumonol Alergol Pol.*, v. 78, p. 279-83, 2010.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M., DE-SÁ-JÚNIOR, P.L., SIMONS, S.M., MARIA, D.A., DE SOUZA VENTURA, J., DE FÁTIMA CORREIA BATISTA, I., FARIA, F., DURÃES, E., REIS, E.M., DEMASI, M. 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*, v. 56, n. 7, p.1145-54, 2010.

COLE, C.L., JAYSON, G.C. Oligosaccharides as anti-angiogenic agents. *Expert Opin Biol Ther*, v.8, p. 351-62, 2008.

CONWAY, M.E., COLLEN, D., CARMELIET, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular research*, v.9, p. 507-21, 2001.

COOK-MILLS, J.M., DEEM, T.L. Active participation of endothelial cells in inflammation. *J Leukoc Biol.*, v. 77, n. 4, p. 487-95, 2005.

CORRAL-RODRIGUEZ, M.A., MACEDO-RIBEIRO, S., BARBOSA PEREIRA, P.J., FUENTES-PRIOR, P. Tick-derived Kunitz-type inhibitors as antihemostatic factors. *Insect Biochem Mol Biol*, v.39, p. 579-95, 2009.

CORVOL, P., LAMANDÉ, N., CRUZ, A., CELERIER, J., GASC, J.M. Inhibition of angiogenesis: a new function for angiotensinogen and des (angiotensin I) angiotensinogen. *Curr Hypertens Rep.*, v. 5, n. 2, p. 149-54, 2003.

CRAVEDI, P., RUGGENENTI, P., REMUZZI, G. Intensified inhibition of renin-angiotensin system: a way to improve renal protection? *Curr Hypertens Rep.*, v. 9, n. 5, p. 430-6, 2007.

CRAWFORD, Y., FERRARA, N. VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies. *Cell Tissue Res.*, v. 335, p. 261-69, 2009.

CUCCIOLONI, M., MOZZICAFREDDO, M., BONFILI, L., CECARINI, V., ELEUTERI, A.M., ANGELETTI, M. Natural occurring polyphenols as template for drug design. Focus on serine proteases. *Chem Biol Drug Des*, v. 74, p. 1-15, 2009.

CUDIC, M., FIELDS, G.B. Extracellular proteases as targets for drug development. *Curr Protein Pept Sci*, v. 10, p. 297-307, 2009.

DAVIS, G.E. Affinity of integrins for damaged extracellular matrix: alpha v beta 3 binds to denatured collagen type I through RGD sites. *Biochem Biophys Res Commun.*, v. 182, n. 3, p. 1025-31, 1992.

DEJANA, E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nature*, v. 5, p. 261-70, 2004.

DELISSER, H.M., CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M., STRIETER, R.M., BURDICK, M.D., ROBINSON, C.S., WEXLER, R.S., KERR, J.S., GARLANDA, C., MERWIN, J.R., MADRI, J.A., ALBELDA, S.M. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol.*, v. 151, n. 3, p. 671-77, 1997.

DELISSER, H.; LUI, Y.; DESPREZ, P.Y.; THOR, A.; BRIASOULI, P.; HANDUMRONGKUL, C.; WILFONG, J.; YOUNT, G.; NOSRATI, M.; FONG, S.; SHTIVELMAN, E.; FEHRENBACH, M.; CAO, G.; MOORE, D.H.; NYACK, S.; LIGGITT, D.; KASHANI-SABET, M.; DEBS, R. Vascular endothelial platelet cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) regulates advanced metastatic progression, *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 107, n. 43, p. 18616-21, 2010.

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

DIMAIO, T.A.; SHEIBANI, N. PECAM-1 isoform-specific functions in PECAM-1-deficient brain microvascular endothelial cells. *Microvasc Res*, v. 72, n. 2, p. 188-201, 2008.

DING, H., TRIGGLE, C.R. Endothelial dysfunction in diabetes: multiple targets for treatment. *Pflugers Arch.*, v. 459, n. 6, p. 977-94, 2010.

DONG, X.; SONG, L.; ZHU, D.; ZHANG, H.; LIU, L.; LENG, X. Tissue factor pathway inhibitor suppresses the growth of human vascular smooth muscle cells through regulating cell cycle. *Mol Biol Rep.*, v. 0, p.00, 2010.

DORMOND, O., LEJEUNE, F.J., RUEGG, C. Modulation of cdk2, cyclin D1, p16INK4a, p21WAF and p27Kip1 expression in endothelial cells by TNF/IFN gamma. *Anticancer Res.*, v. 22, n. 6, p. 3159-63, 2002.

DORRELL, M.I., AGUILAR, E., FRIEDLANDER, M. Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v. 43, n. 11, p. 3500-10, 2002.

DUPREZ, L., WIRAWAN, E., VANDEN BERGHE, T., VANDENABEELE, P. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect.*, v. 11. N. 13, p. 1050-62, 2009.

DVORAK, H.F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol.*, v. 20, n. 21, p. 4368-80, 2002.

EKSTRAND, J.; RAZUVAEV, A.; FOLKERSEN, L.; ROY, J.; HEDIN, U. Tissue factor pathway inhibitor-2 is induced by fluid shear stress in vascular smooth muscle cells and affects cell proliferation and survival. *J Vasc Surg.*, v. 52, n. 1, p.167-75, 2010.

ELIAS, C.G., SPELLBERG, J.P. Ligation of CD31/PECAM-1 modulates the function of lymphocytes, monocytes and neutrophils. *Eur J Immunol*, v. 28, n. 6, p. 1948-58, 1998.

ELICEIRI, B.P, PAUL, R., SCHWARTZBERG, P.L., HOOD, J.D., LENG, J., CHERESH, D.A. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell*, v. 4, p. 915-24, 1999.

ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, v.35, p. 495-16, 2007.

FERRARA N, HENZEL W.J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Bioph Res Co*, v 161, p. 851-58, 1989.

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

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer*. v.32^a, n. 14, p. 2413-22, 1996.

FERRARA, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer.*, v. 2. N. 10, p. 795-803, 2002.

FERRARA, N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur. Cytokine Netw.*, v. 20, n. 4, p. 158-63, 2009.

FERRARA, N., HOUCK, K.A., JAKEMAN, L.B., WINER, J., LEUNG, D.W. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem.*, v. 47, n. 3, p. 211-18, 1991.

FOLKMAN, J. Angiogenesis. *Annual review of medicine*, v. 57, p. 1-18, 2006.

FOLKMAN, J., HOCHBERG, M. Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med*, v. 138, p. 745-753, 1973.

FRANCAVILLA, C., MADDALUNO, L., CAVALLARO, U. The functional role of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis. *Semin Cancer Biol.*, v. 19, n. 5, p. 298-309, 2009.

FRANCISCHETTI, I.M., MY PHAM, V., MANS, B.J., ANDERSEN, J.F., MATHER, T.N., LANE, R.S., RIBEIRO, J.M. The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem Mol Biol.*, v. 35, p. 10, p. 1142-61, 2005.

FRIEDLANDER, M., BROOKS, P.C., SHAFFER, R.W., KINCAID, C.M., VARNER, J.A., CHERESH, D.A. Definition of two angiogenic pathways by distinct alphav integrins. *Science*, v. 270, p. 1500-02, 1995.

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. The Toxicogenomic Multiverse: Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, v. 10, p. 483-511, 2009.

FUJINAGA, M., CHERNEY, M.M., OYAMA, H., ODA, K., JAMES, M.N. The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from cytalidium lignicolum. *Proc Natl Acad Sci.*, v. 101, p. 3364-69, 2004.

FUJIWARA, K. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and mechanotransduction in vascular endothelial cells. *J Intern Med.*, v. 259, n. 4, p. 373-80, 2006.

GALON, J., COSTES, A., SANCHEZ-CABO, F., KIRILOVSKY, A., MLECNIK, B., LAGORCE-PAGÈS, C., TOSOLINI, M., CAMUS, M., BERGER, A., WIND, P., ZINZINDOHOUE, F., BRUNEVAL, P., CUGNENC, P.H., TRAJANOSKI, Z., FRIDMAN, W.H., PAGÈS, F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, v. 313, n. 5795, p. 1960-64, 2006.

GERHARDT, H., GOLDING, M., FRUTTIGER, M., RUHRBERG, C., LUNDKVIST, A., ABRAMSSON, A., JELTSCH, M., MITCHELL, C., ALITALO, K., SHIMA, D., BETSHOLTZ, C. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol.*, v. 161, n. 6, p. 1163-77, 2003.

GHERSI, G. Roles of molecules involved in epithelial/mesenchymal transition during angiogenesis. *Front. Biosci.*, v. 13, p. 2335-55, 2008.

GHO, Y.S., KLEINMAN, H.K. SOSNE, G. Angiogenic activity of human soluble intercellular adhesion molecule-1. *Cancer Res*, v. 59, p. 5128-32, 1999.

GILLE, H., KOWALSKI, J., LI, B., LECOUTER, J., MOFFAT, B., ZIONCHECK, T.F., PELLETIER, N., FERRARA, N. 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*, v. 276, 3222-30, 2001.

GOLDBERG, R.J., NAKAGAWA, T., JOHNSON, R.J., THURMAN, J.M. The Role of Endothelial Cell Injury in Thrombotic Microangiopathy. *Am J Kidney Dis.*, v. 13, 2010.

GONG, N., CHATTERJEE, S. Platelet endothelial cell adhesion molecule in cell signaling and thrombosis, molecular and Cellular. *Biochemistry*, v. 253, p. 151-58, 2003.

GONG, Y., KOH, D.R. Neutrophils promote inflammatory angiogenesis via release of preformed VEGF in an in vivo corneal model. *Cell Tissue Res.*, v. 339, n. 2, p. 437-48, 2010.

GRAMOUN, A., SHOREY, S., BASHUTSKI, J.D., DIXON, S.J., SIMS, S.M., HEERSCHKE, J.N., MANOLSON, M.F. Effects of Vitaxin, a novel therapeutic in trial for metastatic bone tumors, on osteoclast functions in vitro. *J Cell Biochem.*, v. 102, n. 2, p. 341-52, 2007.

GRANA, X., REDDY, E.P Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinases inhibitors (CKIs). *Oncogene*, v. 11, p. 211-19, 1995.

GREENE, C.M., MCELVANEY, N.G. Proteases and antiproteases in chronic neutrophilic lung disease - relevance to drug discovery. *Br J Pharmacol*, v. 158, p. 1048-58, 2009.

GUEDES, E.; LEITE, R.C.; PRATA, M.C.; PACHECO, R.C.; WALKER, D.H. & LABRUNA, M.B. 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*, v. 100, n. 8, p. 841-50, 2005.

GUO, W., GIANCOTTI, F.G. Integrin signaling during tumor progression. *Nat Rev. Mol. Cell Biol.*, v. 5, n. 10, p. 816-26, 2004.

GUTHEIL, J.C., CAMPBELL, T.N., PIERCE, P.R., WATKINS, J.D., HUSE, W.D., BODKIN, D.J., CHERESH, D.A. Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin alphavbeta3. *Clin Cancer Res.*, v. 6, n. 8, p. 3056-61, 2000.

HAANEN, J.B., BAARS, A., GOMEZ, R., WEDER, P., SMITS, M., DE GRUIJL, T.D., VON BLOMBERG, B.M., BLOEMENA, E., SCHEPER, R.J., VAN HAM, S.M., PINEDO, H.M., VAN DEN EERTWEGH, A.J. Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival in resected advanced-stage melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother.*, v. 55, n. 4, p. 451-58, 2006.

HARDER, Y., AMON, M., ERNI, D., MENDER, D. Evolution of Ischemic tissue injury in a random pattern flap: a new mouse model using intravital microscopy. *J.Surg. Res.*, v. 121, p. 197-205, 2004.

HEDSTROM, L. Serine Protease Mechanism and Specificity *Chem. Rev.*, v. 102, p. 4501-23, 2002.

HEISSIG, B., NISHIDA, C., TASHIRO, Y., SATO, Y., ISHIHARA, M., OHKI, M., GRITLI, I., ROSENKVIST, J., HATTORI, K. Role of neutrophil-derived matrix metalloproteinase-9 in tissue regeneration. *Histol Histopathol.*, v. 25, n. 6, p. 765-70, 2010.

HELLSTROM, M., PHNG, L.K., GERHARDT, H. VEGF and Notch signaling: the yin and yang of angiogenic sprouting. *Cell Adhesion & Migration*, v. 1, n. 3, p. 133-36, 2007.

HICKLIN, D.J., ELLIS, L.M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J. Clin. Oncol.*, v. 23, p. 1011-27, 2005.

HILL, J.M., ZALOS, G., HALCOX, J.P., SCHENKE, W.H., WACLAWIW, M.A., QUYYUMI, A.A., FINKEL, T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*, v. 348, p. 593-600, 2003.

HOEBEN, A., LANDUYT, B., HIGHLEY, M.S., WILDIERS, H., VAN OOSTEROM A.T., DE BRUIJN, E.A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.*, v. 56, n. 4, p. 549-80, 2004.

HOFER, E., SCHWEIGHOFER, B. Signal transduction induced in endothelial cells by growth factor receptors involved in angiogenesis. *Thromb Haemost.*, v. 97, n. 3, p. 355-63, 2007.

HONG, Y.K., LANGE-ASSCHENFELDT, B., VELASCO, P., HIRAKAWA, S., KUNSTFELD, R., BROWN, L.F., BOHLEN, P., SENGHER, D.R., DETMAR, M. VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *FASEB J.*, v. 18, n. 10, p. 1111-13, 2004.

HORTA, M.C., LABRUNA, M.B., SANGIONI, L.A., VIANNA, M.C., GENNARI, S.M., GALVAO, M.A., MAFRA, C.L., VIDOTTO, O., SCHUMAKER, T.T., WALKER, D.H. 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.*, v. 71, p. 93-97, 2004.

HUMPHRIES, J.D., BYRON, A., HUMPHRIES, M.J. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci.*, v. 119, n. 19, p. 3901-03, 2006.

HUO, Y., LEY, K. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand.*, v. 173, n. 1, p. 35-43, 2001.

HUVENEERS, S., DANEN, E.H. The interaction of SRC kinase with beta3 integrin tails: a potential therapeutic target in thrombosis and cancer. *Scientific World Journal*, v. 15, p. 1100-05, 2010.

HWANG, S.R., BUNDEY, R., TONEFF, T., HOOK, V. Endopin serpin protease inhibitors localize with neuropeptides in secretory vesicles and neuroendocrine tissues. *Neuroendocrinology*, v. 89, p. 210-16, 2009.

HYNES, R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.*, v. 110, n. 6, p. 673-87, 2002.

HYNES, R.O. The emergence of integrins: a personal and historical perspective. *Matrix Biol.*, v. 23, n. 6, p. 333-40, 2004.

ILAN, N., MADRI, J.A. PECAM-1: old friend, new partners. *Curr Opin Cell Biol*, v.15, p. 515-24, 2003.

ISLAM, M.K, TSUJI, N., MIYOSHI, T., ALIM, M.A., HUANG, X., HATTA, T., FUJISAKI, K. The Kunitz-like modulatory protein haemangin is vital for hard tick blood-feeding success. *PLoS Pathog*, v. 5, e1000497, 2009.

IVANCIU, L., GERARD, R.D., TANG, H., LUPU, F., LUPU, C. Adenovirus-mediated expression of tissue factor pathway inhibitor-2 inhibits endothelial cell migration and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 27, 310-16, 2007.

JACKSON, D.E. The unfolding tale of PECAM-1. *FEBS Lett.*, v. 540, n. 1-3, p. 7-14, 2003.

JEMAL, A., SIEGEL, R., WARD, E., MURRAY, T., SMIGAL, C., THUN, M.J. Cancer Statistics. *J. Clin.*, v. 56, p. 106-30, 2006.

KARAMYSHEVA, A. F. Mechanisms of Angiogenesis, v. 73, n. 7, p. 751-62, 2008.

KATAOKA, H., ITOH, H., KOONO, M. Emerging multifunctional aspects of cellular serine proteinase inhibitors in tumor progression and tissue regeneration. *Pathol Int*, v. 52, p. 89-102, 2002.

KEVIL, C.G.; ORR, A.W.; LANGSTON, W.; MICKETT, K.; MURPHY-ULLRICH, J.; PATEL, R.P.; KUCIK, D.F.; BULLARD, D.C. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) regulates endothelial cell motility through a nitric oxide-dependent pathway, *J Biol Chem*, v. 279, n. 18, p. 19230-8, 2004.

KONDO, S.; SCHEEF, E.A.; SHEIBANI, N.; SORENSON, C.M. PECAM-1 isoform-specific regulation of kidney endothelial cell migration and capillary morphogenesis. *Am J physiol Cell Physiol.*, v. 292, n. 6, p. 2070-83, 2007.

KECK, P.J., HAUSER S.D., KRIVI G. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*, v. 246, p.1309-12, 1989.

KEMPEN, L.C., LEENDERS, W.P. Tumours can adapt to anti-angiogenic therapy depending on the stromal context: lessons from endothelial cell biology. *European journal of cell biology*, v. 85, n. 2, p. 61-8, 2006.

KESISIS, G., BROXTERMAN, H., GIACCONE, G. Angiogenesis inhibitors. Drug selectivity and target specificity. *Curr. Pharm. Des.*, v. 13, n. 27, p. 795-809, 2007.

KEVIL, C.G., ORR, A.W., LANGSTON, W., MICKETT, K., MURPHY-ULLRICH, J., PATEL, R.P., KUCIK, D.F., BULLARD, D.C. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) regulates endothelial cell motility through a nitric oxide-dependent pathway. *J Biol Chem.*, v. 279, n. 18, p. 19230-8, 2004.

KIM, C.S., WANG, T., MADRI, J.A. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 expression modulates endothelial cell migration *in vitro*. *Lab Invest.*, v. 78, n. 5, p. 583-90, 1998.

KOBAYASHI, H., SUZUKI, M., HIRASHIMA, Y., TERAOKA, T. The protease inhibitor bikunin, a novel anti-metastatic agent. *Biol Chem*, v. 384, p. 749-54, 2003.

KOBAYASHI, H., SUZUKI, M., TANAKA, Y., HIRASHIMA, Y., TERAOKA, T. 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*, v. 276, p. 2015-22, 2001.

KOH, D.C., ARMUGAM, A., JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol Life Sci*, v. 63, n. 24 p. 3030-41, 2006.

KONDRAGANTI, S., GONDI, C.S., GUJRATI, M., MCCUTCHEON, I., DINH, D.H., RAO, J.S., OLIVERO, W.C. 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*, v. 29, 25-32, 2006.

KRAUT, J. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annu Rev Biochem*, v. 46, p. 331-58, 1977.

KROEMER, G., GALLUZZI, L., VANDENABEELE, P., ABRAMS, J., ALNEMRI, E.S., BAEHRECKE, E.H., BLAGOSKLONNY, M.V., EL-DEIRY, W.S., GOLSTEIN, P., GREEN, D.R., HENGARTNER, M., KNIGHT, R.A., KUMAR, S., LIPTON, S.A., MALORNI, W., NUÑEZ, G., PETER, M.E., TSCHOPP, J., YUAN, J., PIACENTINI, M., ZHIVOTOVSKY, B., MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. *Cell Death and Differentiation*, v. 16, p. 3-11, 2009.

KROWARSCH, D., CIERPICKI, T., JELEN, F., OTLEWSKI, J. Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cell Mol Life Sci*, v. 60, p. 2427-44, 2003.

LABAT-ROBERT, J. Fibronectin in malignancy. *Semin Cancer Biol.*, v. 12, n. 3, p. 187-95, 2002.

LANGSTON, W.; CHIDLOW, J.H.; BOOTH, B.A.; BARLOW, S.C.; LEFER, D.L.; PATEL, R.P.; KEVIL, C.G. Regulation of endothelial glutathione by icam-1 governs VEGF-A-mediated eNOS activity and angiogenesis. *Free Radic Biol Med*, v. 42, n. 5, p. 720-9, 2007.

LANZER, D., SANTOS, R.A., ETELVINO, G.M., XAVIER, C.H., DE ALMEIDA SANTOS, J., MENDES, E.P., MACHADO, L.T., PREZOTO, B.C., DIVE, V., DE CAMARGO, A.C.. Do the cardiovascular effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) I involve ACE-independent mechanisms? new insights from proline-rich peptides of *Bothrops jararaca*. *Pharmacol Exp. Ther.*, v. 322, n. 2, p. 795-805, 2007.

LASKOWSKI, M. JR., QUASIM, M. A. What can the structures of the enzyme-inhibitor complexes cell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochemical Bophisica Acta*, v. 1477, p. 324-37, 2000.

LEE, W.L., SLUTSKY, A.S. Sepsis and endothelial permeability. *N Engl J Med.*, v. 263, n. 7, p. 689-91, 2010.

LESLIE, J.D., ARIZA-MCNAUGHTON, L., BERMANGE, A.L., MCADOW, R., JOHNSON, S.L., LEWIS, J. Endothelial signaling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis. *Development*, v. 134, p. 839-44, 2007.

LEUNG, D.W, CACHIANES, G., KUANG, W.J, GOEDDEL, D.V., FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, v. 246, p. 1306-09, 1989.

LEVINE, M.N. New antithrombotic drugs: potential for use in oncology. *J Clin Oncol*, v. 27, p. 4912-18, 2009.

LIA, N.G., SHIB, Z.H., TANG, Y.P., DUAN, J.A. Selective matrix metalloproteinase inhibitors for cancer. *Curr Med Chem*, v. 16, p. 3805-27, 2009.

LOBOV, I.B., RENARD, R.A., PAPADOPOULOS, N., GALE, N.W., THURSTON, G., YANCOPOULOS, G.D., WIEGAND, S.J. Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci*, v. 104, n. 9, p. 3219-24, 2007.

LOSKUTOFF, D.J., CURRIDEN, S.A., HU, G., DENG, G. Regulation of cell adhesion by PAI-1. *APMIS*, v. 107, n. 1, p. 54-61, 1999.

LUTZKY, V.P., CARNEVALE, R.P. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) recycles and induces cell growth inhibition on human tumor cell lines. *J Cell Biochem*, v. 98, n. 5, p. 1334-50, 2006.

LYONS, A.B. Analysing cell division *in vivo* and *in vitro* using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution, *Journal of Immunological Methods*, v. 243, n. 1-2, p. 147-154, 2000.

LWALEED, B.A., BASS, P.S. Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *J Pathol*, v. 208, p. 327-39, 2006.

MACDONALD, T.J., STEWART, C.F., KOCAK, M., GOLDMAN, S., ELLENBOGEN, R.G., PHILLIPS, P., LAFOND, D., POUSSAINT, T.Y., KIERAN, M.W., BOYETT, J.M., KUN, L.E. Phase I clinical trial of cilengitide in children with refractory brain tumors: Pediatric Brain Tumor Consortium Study PBTC-012. *J Clin Oncol*, v.26, n 6, p. 919-24, 2008.

MAHABELESWAR, G.H.; CHEN, J.; FENG, W.; SOMANATH, P.R.; RAZORENOVA, O.V.; BYZOVA, T.V. Integrin affinity modulation in angiogenesis *Cell Cycle*, v. 7, n. 3, p. 335-347, 2008.

MANNELLO, F. Natural bio-drugs as matrix metalloproteinase inhibitors: new perspectives on the horizon? *Recent Patents Anticancer Drug Discov*, v. 1, n. 1, p. 91-103, 2006.

MANS, B.J., ANDERSEN, J.F., SCHWAN, T.G., RIBEIRO, J.M. Characterization of anti-hemostatic factors in the argasid, *Argas monolakensis*: implications for the evolution of blood-feeding in the soft tick family. *Insect Biochem Mol Biol*, v. 38, n. 1, p. 22-41, 2008.

MANS, B.J., RIBEIRO, J.M. Function, mechanism and evolution of the moubatin-clade of soft tick lipocalins. *Insect Biochem Mol Biol*, v. 38, p. 841-52, 2008.

MATO, M., OOKAWARA, S., NAMIKI, T. Studies on the vasculogenesis in rat cerebral cortex. *Anat Rec*, v. 224, n. 3, p. 355-64, 1989.

MATSUI, T., FUJIMURA, Y., TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta*, v. 1477, n. 1-2, p. 146-56, 2000.

MELINO, G., KNIGHT, R.A., NICOTERA, P. How many ways to die? How many different models of cell death? *Cell Death and Differentiation*, v. 12, p. 1457-62, 2005.

METTOUCHI, A., KLEIN, S., GUO, W., LOPEZ-LAGO, M., LEMICHEZ, E., WESTWICK, J.K., GIANCOTTI, F.G. Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. *Mol Cell*, v. 8, n. 1, p. 115-27, 2001.

MILLERS, E.K., MASCI, P.P., LAVIN, M.F., DE JERSEY, J., GUDDAT, L.W. 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.*, v. 62, n. 7, p. 642-5, 2006.

MOLINA, J.M., HILL, A., Darunavir (TMC114): a new HIV-1 protease inhibitor. *Expert Opin Pharmacother.*, v. 8, n. 12, p. 1951-64, 2007.

NABORS, L.B., MIKKELSEN, T., ROSENFELD, S.S., HOCHBERG, F., AKELLA, N.S., FISHER, J.D., CLOUD, G.A., ZHANG, Y., CARSON, K., WITTEMER, S.M., COLEVAS, A.D., GROSSMAN, S.A. Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol.*, v. 25, n. 13, p. 1651-70, 2007.

NEREM, R. M., HARRISON, D. G., TAYLOR, W. R., ALEXANDER, R. W., Hemodynamics and vascular endothelial biology. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, v. 21, n. 1, p. 6-10, 1993.

NEUFELD, G., COHEN, T., GENGRINOVITCH, S., POLTORAK, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.*, v. 13, n. 1, p. 9-22, 1999.

NEURATH, H., WALSH, K.A. Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review). *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 73, p. 3825-32, 1976.

NEWMAN, P.J., NEWMAN, D.K. Signal Transduction Pathways Mediated by PECAM-1: New Roles for an Old Molecule in Platelet and Vascular Cell Biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 23, p. 953-64, 2003.

NOEL, A.; MAILLARD, C.; ROCKS, N. Membrane associated proteases and their inhibitors in tumour angiogenesis, *A J Clin Pathol*, v. 57, p. 577-584, 2004.

NUSSENBAUM, F., HERMAN, M.I. Tumor Angiogenesis: Insights and Innovations. *Journal of Oncology*, v. 132, p. 641-56, 2010.

OLSSON, A.K, DIMBERG, A., KREUGER, J., CLAESSION-WELSH, L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, v. 7, n. 5, p. 359-71, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (WHO), Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>, Acessado em 19.01.2010.

OTLEWSKI, J., JELEN, F., ZAKRZEWSKA, M., OLEKSY, A. The many faces of protease-protein inhibitor interaction. *EMBO J*, v. 24, p. 1303-10, 2005.

PAN, R.; DAI, Y.; GAO, X.; LU, D.; XIA, Y. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by scopoletin 2 through interrupting the

autophosphorylation of VEGF receptor 2 and its 3 downstream signaling pathways, *Vascular Pharmacology*, v. 54, n. 1-2, p. 18-28, 2010.

PARK, C.M, PARK, M.J., KWAK, H.J., MOON, S.I., YOO, D.H., LEE, H.C., PARK, I.C., RHEE, C.H., HONG, S.I. Intruduction o p53-mediated apoptosis and recovery of chemosensitivity through p53 transduction in human glioblastoma cells by cisplatin, *Int J Oncol*, v. 28, n. 1, p. 119-25, 2006.

PARK, S., DIMAIO, T.A., SCHEEF, E.A., SORENSON, C.M., SHEIBANI, N. PECAM-1 Regulates the Proangiogenic Properties of Endothelial Cells through Modulation of Cell-Cell and Cell-Matrix Interactions. *Am J Physiol Cell Physiol*.v. 00, p. 00, 2010.

PEAULT, B., RUDNICKI, M., TORRENTE, Y., COSSU, G., TREMBLAY, J.P., PARTRIDGE, T. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther*, v. 15, n. 5, p. 867-77, 2007.

PERALES, J., NEVES-FERREIRA, A.G., VALENTE, R.H., DOMONT, G.B. Natural inhibitors of snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Toxicon*, v. 45, n. 8, p. 1013-20, 2005.

PÉREZ, J.C., SÁNCHEZ, E.E. Natural protease inhibitors to hemorrhagins in snake venoms and their potential use in medicine. *Toxicon*, v. 37, n. 5, p. 703-28, 1999.

PETRUZZELLI, L., TAKAMI, M., HUMES, H.D. Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med*, v. 106, n. 4, p. 467-76, 1999.

POBER, J., CONTRAN, R.S. What can be learned from the expression of endothelial adhesion molecules in Tissues. *Lab Invest*, v. 64, n. 3, p. 301-05. 1991.

POGGI, A.; PREVOSTO, C.; CATELLANI, S.; ROCCO, I.; GARUTI, A.; ZOCCHI, M.R. Engagement of CD31 delivers an activating signal that contributes to the survival of chonic lymphocytic leukaemia cells, *Br J Haematol*, v. 151, n. 3, p. 252-64, 2010.

POON, I.K.H., HULETT, M.D., PARISH, C.R. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death and Diferentiation*, v. 17 p. 381-97, 2010.

PORTA, C., LARGHI, P., RIMOLDI, M., TOTARO, M.G., ALLAVENA, P., MANTOVANI, A., SICA, A. Cellular and molecular pathways linking inflammation and cancer. *Immunobiology*, v. 214, n. 9-10, p. 761-77, 2009.

PREISSNER, K.; NAWROTH, P. P., KANSE, S. M. Vascular protease receptors: integrating haemostasis and endothelial cell functions. *The Journal of Pathology*, v. 190, n. 3, p. 360-372, 2000.

PRIVRATSKY, J.R.; NEWMAN, D.K.; NEWMAN, P.J. PECAM-1: conflicts of interest in inflammation. *Life Sci*, v. 87, n. 3-4, p. 69-82, 2010.

PROVENÇAL, M.; MICHAUD, M.; BEAULIEU, E.; RATEL, D.; RIVARD, G.; GINGRAS, D.; BÉLIVEAU, R. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) interferes with endothelial cell migration by inhibition of both the Erk pathway and focal adhesion proteins. *Thromb Haemost*, v. 99, n. 576-585, 2008.

RAMJAUN, A.R., HODIVALA-DILKE, K. The role of cell adhesion pathways in angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.*, v. 41, n. 3, p. 521-30, 2009.

RAO, R.M., YANG, L., GARCIA-CARDENA, G., LUSCINSKAS, F.W. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ Res.*, v. 101, n. 3, p. 234-47, 2007.

RED-HORSE, K., CRAWFORD, Y., SHOJAEI, F., FERRARA, N., Endothelium microenvironment interactions in the developing embryo and in the adult. *Dev Cell*, v. 12, p. 181-94, 2007.

RIBATTI D. Chick embryo chorioallantoic membrane as a useful tool to study angiogenesis. *Int Rev Cell Mol Biol.*, v. 270, p.181-224, 2008.

RINI, B.I., SMALL, E.J. Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*, v. 23, p. 1028-1043, 2005.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, v. 386, p. 671-74, 1997.

ROBERTS, O.L., HOLMES, K., MULLER, J., CROSS, D.A., CROSS, M.J. ERK5 and the regulation of endothelial cell function. *Biochem Soc Trans*, v. 37, p. 1254-59, 2009.

ROCA, C., ADAMS, H.R. Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes Dev*, v. 21, p. 2511-24, 2010.

ROEMISCH, J.; GRAY, E.; HOFFMANN, J.N.; WIEDERMANN, C.J. Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis*, v. 13, n. 8, p. 657-70, 2002.

ROOPRAI, H. K., VANMETER, T., PANOU, C., SCHNULL, S., TRILLO-PAZOZ, G., DAVIES, D., PILKINGTON, G. J. The role of integrin receptors in aspects of glioma invasion in vitro. *Int. J. Dev. Neurosci*, v. 17, n. 5-6, p. 613-23, 1999.

ROSENTHAL, M.A., DAVIDSON, P., ROLLAND, F., CAMPONE, M., XUE, L., HAN, T.H., MEHTA, A., BERD, Y., HE, W., LOMBARDI, A. Evaluation of the safety, pharmacokinetics and treatment effects of an alpha(nu)beta(3) integrin inhibitor on bone turnover and disease activity in men with hormone-refractory prostate cancer and bone metastases. *Asia Pac J Clin Oncol.*, v. 6, p. 42-48, 2010.

ROWAN, E.G. What does beta-bungarotoxin do at the neuromuscular junction? *Toxicon*, v. 39, n. 1, p. 107-18, 2001.

RUCAVADO, A., ESCALANTE, T., GUTIÉRREZ, J.M. Effect of the metalloproteinase inhibitor batimastat in the systemic toxicity induced by *Bothrops asper* snake venom: understanding the role of metalloproteinases in envenomation. *Toxicon*, v. 43, n. 4, p. 417-24, 2004.

RUHRBERG, C., GERHARDT, H., GOLDING, M., WATSON, R., IOANNIDOU, S., FUJISAWA, H., BETSHOLTZ, C., SHIMA, D.T. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev*, v. 16, n. 20, p. 2684-98, 2002.

SAINSON, A.C.R., HARRIS, L.A. Regulation of angiogenesis by homotypic and heterotypic notch signalling in endothelial cells and pericytes: from basic research to potential therapies. *Angiogenesis*, v. 11, p. 41-51, 2008.

SCHMIDT-LUCKE, C., ROSSIG, L., FICHTLSCHERER, S., VASA, M., BRITTEN, M., KAMPER, U, DIMMELER, S., ZEHER, A.M. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation*, v. 111, p. 2981-87, 2005.

SENGER, D.R., GALLI, S.J., DVORAK, A.M., PERRUZZI, C.A., HARVEY, V.S., DVORAK, H.F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of scites fluid. *Science*, v. 219, p. 983-85, 1983.

SERRANO, S.M., MAROUN, R.C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*, v. 45, n. 8, p. 1115-32, 2005.

SIERKO, E, WOJTUKIEWICZ, MZ, KISIEL, W. The role of tissue factor pathway inhibitor-2 in cancer biology. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 7, 653-9, 2007.

SHAH, I.M., DI NAPOLI, M. The ubiquitin-proteasome system and proteasome inhibitors in central nervous system diseases. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.*, v. 7, n. 4, p. 250-73, 2007.

SHAKIBA, Y., MANSOURI, K., MOSTAFAIE, A. Anti-angiogenic effect of soybean kunitz trypsin inhibitor on human umbilical vein endothelial cells. *Fitoterapia*, v. 78, p. 587-89, 2007.

SHARMA, M.C; SHARMA, M. The role of annexin II in angiogenesis and tumor progression: a potential therapeutic target. *Curr. Pharm. Des.*, v. 13, n. 35, p. 3568-75, 2007.

SHARMA, A.; YU, C.; LEUNG, C.; TRANE, A.; LAU, M.; UTOKAPARCH, S.; SHAHEEN, F.; SHEIBANI, N.; BERNATCHEZ, P. A new role for the muscle repair protein dysferlin in endothelial cell adhesion and angiogenesis, v. 30, n. 11, p. 2196-204, 2010.

SHATTIL, S.J., KIM, C., GINSBERG, M.H. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, v. 11, n. 4, p. 288-300, 2010.

SHEIBANI, N., FRAZIER, W.A. Thrombospondin-1, PECAM-1, and regulation of angiogenesis. *Histol Histopathol*, v. 14, p. 285-94, 1999.

SHERR C.J., ROBERTS J.M. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, v. 18, p. 2699-711, 2004.

SHERR, C.J. Cancer cell cycles. *Science*, v. 274, p. 1672-7, 1996.

SHPACOVITCH, V., FELD, M., HOLLENBERG, M.D., LUGER, T.A., STEINHOFF, M. Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol*, v. 83, p. 1309-22, 2008.

SICA, A., ALLAVENA, P., MANTOVANI, A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett.*, v. 267, n. 2, p. 204-15, 2008.

SIEKMANN, A.F., LAWSON, N.D. Notch signalling and the regulation of angiogenesis. *Cell adhesion & migration*, v. 2, p. 104-06, 2007.

SLEVIN, M., KRUPINSKI, J. A role for monomeric C-reactive protein in regulation of angiogenesis, endothelial cell inflammation and thrombus formation in cardiovascular/cerebrovascular disease? *Histol Histopathol.*, v. 24, n. 11, p. 1473-78, 2009.

SMITH, C.W. Adhesion molecules and receptors. *J. Allergy Clin Immunol.*, v. 121, n. 2, p. 375-79, 2007.

SMITH, R.P., HIGUCHI, D.A., BROZE, G.J. Platelet coagulation factor XIa-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein. *Science*, v. 248, p. 1126-28, 1990.

SMITH, H.S.; MARSHALL, C.J. Regulation of cell signalling by uPAR, *Molecular cell Biology*, v. 1, n. 1, p. 23-36, 2010.

SOLDI, R.; MITOLA, S.; STRASLY, M.; DEFILIPPI, P.; TARONE, G.; BUSSOLINO, F. Role of avb3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2, *The EMBO Journal*, v. 18, n.4, p.882–892, 1999.

SOLOWIEJ, A., BISWAS, P., GRAESSER, D., MADRI, J.A. Lack of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 attenuates foreign body inflammation because of decreased angiogenesis. *Am J Pathol.*, v. 162, n. 3, p. 953-62, 2003.

STATHAKIS, P., LAY, A.J., FITZGERALD, M., SCHLIEKER, C., MATTHIAS, L.J., HOGG, P.J. Angiostatin formation involves disulfide bond reduction and proteolysis in kringle 5 of plasmin. *J Biol Chem*, v. 274, p. 8910-16, 1999.

STAUNTON, D.E., DUSTIN, M.L. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell.*, v. 61, n. 2, p. 243-54, 1990.

STATON, C. A., REED, M. W. R., BROWN A critical analysis of current *in vitro* and *in vivo* angiogenesis assays. *Int J. Exp. Path.*, v. 90, p. 195-221, 2009.

STEFANSSON, S., LAWRENCE, D.A. The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin. *Nature*, v. 383, n. 6599, p. 441-43, 1996.

STEPHENS, R.W.; BRÜNNER, N.; JÄNICKE, F.; SCHMITT, M. The urokinase plasminogen activator system as a target for prognostic studies in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, v. 52, n. 1-3, p. 99-111, 1998.

SU, L.; XU, X.; ZHAO, H.; GU, Q.; ZOU, H. *In vitro* and *in vivo* antiangiogenic activity of a novel deca-peptide derived from human tissue-type plasminogen activator kringle 2 *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 396, p. 1012–1017, 2010.

SUCHTING, S., FREITAS, C., LE NOBLE, F., BENEDITO, R., BREANT, C., DUARTE, A., EICHMANN, A. The Notch ligand Deltalike 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 104, p. 3225–30, 2007.

TASKINEN, M.; JANTUNEN, E.; KOSMA, V.M.; BONO, P.; KARJALAINEN-LINDSBERG, M.L.; LEPPÄ, S. Prognostic impact of CD31-positive microvessel density in follicular lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Eur J Cancer*, v. 46, n. 13, p. 2506-12, 2010.

TAKADA, Y., YE, X., SIMON, S. The integrins. *Genome Biol.*, v. 8, n. 5, p. 215-21, 2007.

TAKAHASHI, A., KATO, K., KUBOYAMA, A., INOUE, T., TAKANA, Y., KUHARA, A., KINOSHITA, K., TAKEDA, S., WAKE, N. Introduction of senescence by progesterone receptor-B activation in response to cAMP in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol*, v. 113, n. 2, p. 270-76, 2009.

TANG, D.G., CHEN, Y. Q. Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium. *J Biol Chem.*, v. 268, n. 30, p. 22883-894, 1993.

TEPPER, O.M. GALIANO, R.D., CAPLA, J.M., KALKA, C., GAGNE, P.J., JACOBOWITZ, G.R., LEVINE, J.P., GURTNER, G.C. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*, v. 106, p. 2781-86, 2002.

TORRES-COLLADO, A.X., KISIEL, W., IRUELA-ARISPE, M.L., RODRIGUEZ-MANZANEQUE, J.C. ADAMTS1 interacts with, cleaves, and modifies the extracellular location of the matrix inhibitor tissue factor pathway inhibitor-2. *J Biol Chem*, v. 281, 17827-837, 2006.

TRIKHA, M., ZHOU, Z., NEMETH, J.A., CHEN, Q., SHARP, C., EMMELL, E., GILES-KOMAR, J., NAKADA, M.T. CNTO 95, a fully human monoclonal antibody that inhibits alphav integrins, has antitumor and antiangiogenic activity *in vivo*. *Int J Cancer.*, v. 110, n. 3, p. 326-35, 2004.

TSOPANOGLIOU, N.E., MARAGOUDAKIS, M.E. Inhibition of angiogenesis by small-molecule antagonists of protease-activated receptor-1. *Semin Thromb Hemost*, v. 33, p. 680-87, 2007.

UNDERWOOD, P.A., BEAN, P.A., CUBEDDU, L. Human endothelial cells grow poorly on vitronectin: role of PAI-1. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 82, p. 98-109, 2001.

VAN NIMWEGEN, M.J., VAN DE WATER, B. Focal adhesion kinase: a potential target in cancer therapy. *Biochem Pharmacol.*, v. 73, n. 5, p. 597-609, 2007.

VAN NOSTRAND, W.E., WAGNER, S.L., FARROW, J.S., CUNNINGHAM, D.D. Immunopurification and protease inhibitory properties of protease nexin-2/amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem*, v. 265, p. 9591-94, 1990.

VERGNOLLE, N. Protease-activated receptors as drug targets in inflammation and pain. *Pharmacol Ther*, v.123, p. 292-309, 2009.

VINCENTI, V., CASSANO, C., ROCCHI, M., PERSICO, G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation.*, v. 93, n. 8, p. 1493-95, 1996.

WAISMAM, K., CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M., CARRIJO-CARVALHO, L.C., PACHECO, M.T., FARSKY, S.H. Lopap: a non-inflammatory and cytoprotective molecule in neutrophils and endothelial cells. *Toxicon*, v. 53, p. 652-9, 2009.

WANG, J., MILNER, R. Fibronectin promotes brain capillary endothelial cell survival and proliferation through $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha v \beta 3$ integrins via MAP kinase signalling. *J Neurochem.*, v. 96, n. 1, p. 148-59, 2006.

WATSON, P.M, HUMPHIRES, M.J., RELTON, J., ROTHWELL, N J., VERKHARASY, A., GIBSON, R.M. Integrin-binding peptides induce rapid intracellular calcium increase and MAPK signaling in cortical neurons. *Mol Cell Neurosc.*, v. 34, p. 147-54, 2007.

WEBER, C., FRAEMOHS, L., DEJANA, E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol.*, v. 7, n. 6, p. 467-77, 2007.

WILLIAMS, R.L., COURTENEIDGE, S.A., WAGNER, E.F. Embryonic lethality of an endothelial tumor in chimeric mice expressing polyoma virus middle T oncogene. *Cell*, v. 52, p. 121-31, 1988.

WILLINGHAM, M.C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 47, p. 1101-09, 1999.

WISE, L.M, VEIKKOLA, T, MERCER, A.A, SAVORY, L.J, FLEMING, S.B, CAESAR, C., VITALI, A., MAKINEN, T., ALITALO, K., STACKER, S.A. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, p. 3071-76, 1999.

WOODFIN, A., VOISIN, M.B., NOURSHARGH, S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol.*, v. 27, n. 12, p. 2514-23, 2007.

XIE, Y., MULLER, W.A. Molecular cloning and adhesive properties of murine platelet/endothelial cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 90, p. 5569-73, 1993.

YAMAZAKI, Y., MORITA, T. Snake venom components affecting blood coagulation and the vascular system: structural similarities and marked diversity. *Curr. Pharmaceutical Design*, v. 13, n. 28, p. 2872-86, 2007.

YANG, W., SHIMAOKA, M. Activation of integrin beta-subunit I-like domains by one-turn C-terminal alpha-helix deletions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, n. 8, p. 2333-38, 2004.

YUSUF-MAKAGIANSAR, H., ANDERSON, M.E., YAKOVLEVA, T.V., MURRAY, J.S., SIAHAAN, T.J. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med Res Rev.*, v. 22, n. 2, p. 146-67, 2002.

ZHOU, Z.; CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M.; GARLANDA, C.; DELISSER, H.M. Antibody against murine PECAM-1 inhibits tumor angiogenesis in mice. *Angiogenesis*, v. 3, n. 2, p. 181-8, 1999.

8. ANEXOS

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Carine Cristiane Drewes)

Página 1 de 3

Carine Cristiane Drewes

Possui graduação em Farmácia pela Universidade Federal de Santa Maria (2006). Atualmente é pós-graduada do Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacéuticas da Universidade de São Paulo. Desenvolve seu projeto de mestrado com toxinas extraídas do venendo do carrapato *Amblyomma cajennense* na linha de angiogênese e inflamação.
(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 02/02/2011

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/2409339581178985>

**Certificado
pelo autor em
02/02/11**

Dados pessoais	
Nome	Carine Cristiane Drewes
Nome em citações bibliográficas	DREWES, Carine Cristiane
Sexo	Feminino
Endereço profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacéuticas, AV Prof. Lineu Prestes 580- BL 13 B Cidade Universitária 05508-900 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30912197 Fax: (11) 38156593 URL da Homepage: http://

Formação acadêmica/Titulação	
2008	Mestrado em andamento em Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, Universidade de São Paulo, USP, Brasil. <i>Título:</i> Caracterização dos efeitos do Amblyomin-X sobre a Angiogênese e Célula Endotelial, <i>Orientador:</i> Profa. Dra. Sandra Helena Polisselli Farsky. <i>Bolsista do(a):</i> Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, ... <i>Palavras-chave:</i> Amblyomin-X; Angiogênese; Célula Endotelial; VEGF.
2003 - 2008	Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Brasil. <i>Título:</i> Participação de mastócitos na dor pós-operatória. <i>Orientador:</i> Juliano Ferreira. <i>Bolsista do(a):</i> Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, ...

Atuação profissional	

Áreas de atuação	
1.	Grande área: Ciências Biológicas / Área: Farmacologia.
2.	Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Análise Toxicológica.

Idiomas	
Inglês	Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Prêmios e títulos	
2010	Mensão honrosa para o trabalho intitulado "Effects of Amblyomin-X on tumor growth, endothelial cell migration, adhesion and secretion", SBFTE.
2009	Menção Honrosa para o trabalho intitulado "Role of Amblyomin-X on Angiogenesis and Endothelial Cell", SBFTE.

Produção em C, T & A	
Produção bibliográfica	
Artigos completos publicados em periódicos	
1.	MILANO, J.; ROSSATO, M. F.; OLIVEIRA, S. M.; DREWES, Carine Cristiane; Machado, P.; Beck, P.; Zanatta, N.; Martins, MAP.; MELLO, C. F.; RUBIN, M. A.; FERREIRA, J.; Bonacorso, H. G. . . Antinociceptive action of 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1H-pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice. Life Sciences (1973) ^{JCR} , v. 21, p. 739-746, 2008.

Resumos publicados em anais de congressos

1. DREWES, Carine Cristiane ; DIAS, R. Y. S. ; HEBEDA, C. B. ; SIMONS, S. M. ; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. ; FARSKY, S. H. P. . Role of Amblyomin-X on angiogenesis and endothelial cell proliferation. In: XII International Congress of Toxicology, 2010, Barcelona. Toxicology Letters, 2010.
2. DIAS, R. Y. S. ; DREWES, Carine Cristiane ; HEBEDA, C. B. ; SIMONS, S. M. ; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. ; FARSKY, S. H. P. . Role of Amblyomin-X on microcirculatory vessels, endothelial cell migration and tumor growth. In: XII International Congress of Toxicology, 2010, Barcelona. Abstract Book/Toxicology Letters, 2010.
3. DREWES, Carine Cristiane ; DIAS, R. Y. S. ; HEBEDA, C. B. ; SIMONS, S. M. ; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. ; FARSKY, S. H. P. . Amblyomin-X impairs VEGF-induced new vessels formation by altering endothelial cell functions. In: 45a Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, 2010, São Paulo. 45a Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, 2010.
4. DIAS, R. Y. S. ; DREWES, Carine Cristiane ; HEBEDA, C. B. ; SIMONS, S. M. ; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. ; FARSKY, S. H. P. . Effects of Amblyomin-X on tumor growth, endothelial cell migration, adhesion and secretion. In: 45a Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, 2010, São Paulo. 45a Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, 2010.
5. DIAS, R. Y. S. ; DREWES, Carine Cristiane ; HEBEDA, C. B. ; SIMONS, S. M. ; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. ; FARSKY, S. H. P. . Effects of Amblyomin-X on tumor growth, endothelial cell migration, adhesion and secretion. In: 42 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2010. 42 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental.
6. DIAS, R. Y. S. ; DREWES, Carine Cristiane ; HEBEDA, C. B. ; TAVASSI, A. M. C. ; FARSKY, S. H. P. . "Role of Amblyomin-X on Angiogenesis and Endothelial Cell Migration". In: 41 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2009, Ribeirão Preto. 41 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2009.
7. TONELLO, R. ; MARCHESAN, S. M. ; DREWES, Carine Cristiane ; TREVISAN, G. ; FERREIRA, J. . Envolvimento dos mastócitos em um modelo de dor pós-cirúrgica em camundongos. In: XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2009, Águas de Lindóia. XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2009.
8. DREWES, Carine Cristiane ; DIAS, R. Y. S. ; HEBEDA, C. B. ; SIMONS, S. M. ; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. ; FARSKY, S. H. P. . Effects of Amblyomin-X on angiogenesis and endothelial cell migration. In: XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2009, São Paulo. XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2009.
9. DREWES, Carine Cristiane ; GEWEHR, C. C. V. ; RUBIN, M. A. ; FERREIRA, J. . Nociceptive Effect of Peripheral Polyamines in mice. In: XXXVI Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2007, Salvador-BA. XXXVI Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2007.
10. DREWES, Carine Cristiane ; FERREIRA, J. . Envolvimento de mastócitos na dor pós-cirúrgica em camundongos. In: XXII Jornada Acadêmica Integrada da UFSM, 2007, Santa Maria-RS. XXII Jornada Acadêmica Integrada da UFSM, 2007.
11. GEWEHR, C. C. V. ; DREWES, Carine Cristiane ; RUBIN, M. A. ; FERREIRA, J. . Peripheral injection of spider Phoneutria nigriventer venom induces nociception in mice. In: XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2007, Salvador-BA. XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2007.
12. DREWES, Carine Cristiane ; CERRETA, A. P. ; CAMERA, K. ; MELLO, C. F. ; FERREIRA, J. ; RUBIN, M. A. . Arcaína causa prejuízo de memória e dependência de estado na tarefa de esquiava inibitória em ratos. In: XXI Reunião Anual da FeSBE, 2006, Águas de Lindóia-SP. XXI Reunião Anual da FeSBE, 2006.
13. DREWES, Carine Cristiane ; GEWEHR, C. C. V. ; RUBIN, M. A. ; CALIXTO, J. C. ; FERREIRA, J. . Efeito nociceptivo causado pela injeção intraplantar de espermina em camundongos. In: XXI Reunião Anual da FeSBE, 2006, Águas de Lindóia-SP. XXI Reunião Anual da FeSBE, 2006.
14. GEWEHR, C. C. V. ; MELLO, C. F. ; SOUZA, A. H. ; DREWES, Carine Cristiane ; LANDERBERGER, D. . Efeito da manipulação prévia altera a analgesia da dipirona. In: XX Jornada acadêmica Integrada da UFSM, 2006, Santa Maria-RS. XX Jornada acadêmica Integrada da UFSM, 2006.
15. DREWES, Carine Cristiane ; MELLO, C. F. ; SOUZA, A. H. ; GEWEHR, C. C. V. ; SINHORIN, V. . Estímulo térmico nocivo no treino não altera a resposta antinociceptiva da dipirona no teste da placa quente. In: XX Jornada acadêmica Integrada da UFSM, 2006, Santa Maria-RS. XX Jornada acadêmica Integrada da UFSM, 2006.
16. DREWES, Carine Cristiane ; GEWEHR, C. C. V. ; RUBIN, M. A. ; MELLO, C. F. ; FERREIRA, J. . Poliaminas causam nociceção em camundongos. In: 21 Jornada Acadêmica Integrada da UFSM, 2006, Santa Maria-RS. 21 Jornada Acadêmica Integrada da UFSM, 2006.
17. GERRA, G. P. ; SAUZEM, P. ; DREWES, Carine Cristiane ; MELLO, C. F. ; RUBIN, M. A. . Avaliação do potencial analgésico e anti-dematogênico de derivados pirazólicos inéditos. In: XIII Encontro de Química da região Sul, 2005, Florianópolis-SC. XIII Encontro de Química da região Sul, 2005.
18. DREWES, Carine Cristiane ; RUBIN, M. A. ; SOUZA, A. H. ; DALMOLIN, G. ; SINHORIN, V. . Naloxona reverte o efeito antinociceptivo induzido por um composto pirazol-biazol (B50). In: XIX Jornada Acadêmica Integrada, 2004, Santa Maria-RS. XIX Jornada Acadêmica Integrada, 2004.

Artigos aceitos para publicação

1. ★ GEWEHR, C. C. V. ; TREVISAN, G. ; DREWES, Carine Cristiane ; RUBIN, M. A. ; FERREIRA, J. . Contribution of Vanilloid Receptor to the Nociception Induced by Peripheral Polyamines in Mice. European Journal of Pharmacology **JCR**, 2011.
2. ★ SOUZA, A. H. ; DREWES, Carine Cristiane ; MASSENSINI, A. ; SILVA, M. A. R. ; FERREIRA, J. ; GOMEZ, M. V. . A new N-type calcium channel blocker for the treatment of pain with few adverse effects. Pain Medicine (Malden, Mass.) **JCR**, 2011.

Apresentações de Trabalho

1. ★ DREWES, Carine Cristiane ; DIAS, R. Y. S. ; HEBEDA, C. B. ; SIMONS, S. M. ; TAVASSI, A. M. C. ; FARSKY, S. H. P. . XII International Congress of Toxicology, 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. DREWES, Carine Cristiane ; DIAS, R. Y. S. ; HEBEDA, C. B. ; TAVASSI, A. M. C. ; FARSKY, S. H. P. . "Effects of Amblyomin-X on Angiogenesis and Endothelial Cell Migration", 2009. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Eventos

Participação em eventos

1. XII International Congress of Toxicology.ROLE OF AMBLYOMIN-x ON ANGIOGENESIS AND ENDOTHELIAL CELL PROLIFERATION. 2010. (Congresso).
2. 45a Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica.Amblyomin-x impairs VEGF-induced new vessels formation by altering endothelial cell functions. 2010. (Outra).
3. 41 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. 2009. (Congresso).
4. XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia. 2009. (Congresso).
5. XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia - Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas."Effects of Amblyomin-X on Angiogenesis and Endothelial Cell Migration". 2009. (Simpósio).
6. Fórum de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 2009. (Outra).
7. XXII Jornada Acadêmica Integrada da UFSM.Envolvimento de Mastócitos na Dor Pós-Cirúrgica em Camundongos. 2007. (Congresso).
8. XXII Jornada Acadêmica Integrada da UFSM. 2007. (Congresso).
9. XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and 10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB).Nociceptive Effect of Peripheral Polyamines in Mice. 2007. (Congresso).
10. XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and 10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). 2007. (Congresso).
11. XXI Jornada Acadêmica Integrada da UFSM.Poliâminas Causam Nociceção em Camundongos. 2006. (Congresso).
12. XXI Jornada Acadêmica Integrada da UFSM. 2006. (Congresso).
13. XX Jornada Acadêmica Integrada da UFSM.Estímulo Térmico Nocivo no Treino Não Altera a Resposta Antinociceptiva da Dipirona na Teste da Placa Quente. 2006. (Congresso).
14. XX Jornada Acadêmica Integrada da UFSM. 2006. (Congresso).
15. XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSB. Efeito Nociceptivo Causado Pela Injeção Intraplantar de Espermina em Camundongos. 2006. (Congresso).
16. XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSB. 2006. (Congresso).
17. XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSB.Arcaina Causa Prejuízo de Memória e Dependência de Estado na Tarefa de Esquiva Inibitória em Ratos. 2006. (Congresso).
18. 5th International Congress of Pharmaceutical Sciences "New perspectives for human and health: challenges for science and technology.Intrathecal (I.T.) administration of a novel pyrazol-thiazole derivative induces antinociception in mice .. 2005. (Congresso).
19. Simpósio Células Tronco e Transgênicos: Biossegurança em Lei. 2005. (Simpósio).
20. XIII Encontro de Química da Região Sul (SBQsul) Avaliação do Potencial Analgésico e Antiedematogênico de Derivados Pirazolinicos Inéditos. 2005. (Encontro).
21. XIX Jornada Acadêmica Integrada da UFSM.Naloxona reverte o efeito antinociceptivo induzido por um composto pirazol-tiazol (B50). 2004. (Congresso).
22. III Oficina de Neurociências- Fronteiras da Investigação. 2004. (Oficina).
23. III Oficina de Neurociências - Fronteiras da investigação. Investigação do Possível Mecanismo de Ação Antinociceptivo de um Composto Pirazol-Tiazol. 2004. (Oficina).
24. III Oficina de Neurociências - Fronteiras da Investigação. Derivado Pirazolinico Diminui Dor Tônica Induzida por Ácido Acético em Camundongos. 2004. (Oficina).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 20/03/2011 às 19:04:11

Ficha do Aluno

Página 1 de 2

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 6723007/1 - Carine Cristiane Drewes

Email: cdrewes@usp.br
Data de Nascimento: 10/09/1984
Cédula de Identidade: RG - 9085340471 - RS
Local de Nascimento: Estado do Rio Grande do Sul
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade Federal de Santa Maria - Rio Grande do Sul - Brasil - 2008

Curso: Mestrado
Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula: 09/03/2009
Início da Contagem de Prazo: 09/03/2009
Data Limite: 09/09/2011
Orientador: Prof(a). Dr(a). Sandra Helena Polisseli Farsky - 09/03/2009 até o presente. E-Mail: sfarsky@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 21/10/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 05/10/2010
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 09/03/2009
 Matrícula de Acompanhamento em 21/02/2011

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/02/2011

Impresso em: 20/03/11 19:05:45

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 6723007/1 - Carine Cristiane Drewes

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5746 2/2	Comprometimento do Sistema Imunológico nas Intoxicações	19/05/2009	29/06/2009	60	4	80	A	N	Concluída
FBC5753 2/1	Processos de Invasão Celular	26/05/2009	06/07/2009	90	6	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC-0440 Análises Toxicológicas, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/07/2009	30/11/2009	-	3	0	-	-	-
FBC5802 2/2	Tópicos Avançados em Toxicologia I	17/08/2009	29/11/2009	30	2	90	A	N	Concluída
EDM5791 5/3	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	19/08/2009	30/11/2009	120	8	91.5	A	N	Concluída
R045842 1/1	Escola de Altos Estudos em Toxicologia (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	30/11/2009	13/12/2009	60	4	95	A	N	Concluída
FBC5729 5/2	Fundamentos Básicos da Avaliação da Toxicidade a Substâncias Químicas	02/03/2010	22/03/2010	75	0	0	-	N	Pré - matrícula recusada
MCM5651 3/1	Adesão Celular e Câncer (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	22/04/2010	24/06/2010	90	0	0	-	N	Pré - matrícula recusada
FBC5803 1/2	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	03/08/2010	16/08/2010	30	2	100	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	25	25
Atividades Programadas:		29

<https://janus.usp.br/janus/alunoGeral/ficha/fichaDoAlunoParaImpressao.jsf>

20/03/2011

Seminários:			
Estágios:			
Total:	25	25	29

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 12/04/2010.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/02/2011

Impresso em: 20/03/11 19:05:45

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