

MIRYAM GUILLERMINA PALOMINO RODRIGUEZ

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTITUMORAIS DA
METALOPROTEINASE OFÍDICA JARARAGINA
NO ADENOCARCINOMA DE MAMA**

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

São Paulo
2012

MIRYAM GUILLERMINA PALOMINO RODRIGUEZ

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

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

Versão original

São Paulo
2012

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

reprodução não autorizada pelo autor

Palomino Rodriguez, Miryam Guillermina.

Avaliação dos efeitos antitumorais da metaloproteinase ofídica jararagina no adenocarcinoma de mama / Miryam Guillermina Palomino Rodriguez. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Oncologia.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the antitumor effects of ophidic metalloproteinase jararhagin in breast adenocarcinoma.

1. Jararagina 2. Câncer de mama 3. Tumor de Ehrlich 4. Inflamação 5. Toxina 6. Apoptose I. Maria, Prof. Dr. Durvanei Augusto II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0166/2012

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

Candidato(a): Miryam Guillermina Palomino Rodriguez.

Título da Dissertação: Avaliação dos efeitos antitumorais da metaloproteinase
ofídica jararagina no adenocarcinoma de mama.

Orientador(a): Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

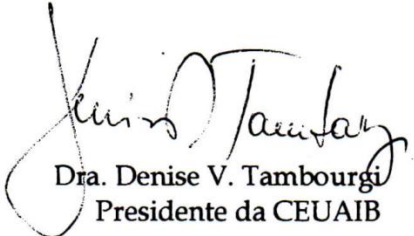
CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do potencial antiproliferativo da metaloproteinase ofídica jararagina no adenocarcinoma de mama de Ehrlich" protocolo nº 765/10, sob a responsabilidade de Durvanei Augusto Maria e Miryam Palomino Rodriguez, 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 NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 12/08/2010.

We certify that the research entitled "Evaluation of antiproliferative potencial of ofidic metalloproteinase jararagina in Ehrlich's breast carcinoma", protocol nº 765/10, under the responsibility of Durvanei Augusto Maria and Miryam Palomino Rodriguez, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 08/12/2010.

Vigência do Projeto: 08/2010 – 12/2012 Laboratório de Bioquímica e Biofísica	Nº de animais/espécie 200 camundongos Balb/c Fêmeas
---	---

São Paulo, 16 de agosto de 2010.


Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:


Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

A meus pais (Adita e Nazario)
e avos (Cipriana e Fortunato),
pelo amor, educação e estímulo, ... os amo!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e inspiração para realizar este trabalho.

Ao professor Dr. Durvanei Augusto Maria por ter acreditado em mim, pela orientação, paciência, amizade, e carinho, que se converteram em fonte de motivação ao longo da realização desta pesquisa.

A Dra. Rose Eli Grassi Ricci, Profa. Dra. Ligia Gomes, pela colaboração e apoio para utilizar as instalações de seus laboratórios, e a Omar pela ajuda na leitura das lâminas.

A Dona Vilma, pela ajuda nos momentos que precisei.

A meus amigos do Laboratório de Bioquímica e Biofísica: Fernanda, Kleber, Álvaro, Ana Rita, Tiago, Janaina, Manuela, Thais, Rose Bosch, Iara, Lara, Norma, Rosa, Aline, Amanda, Camila, Sonia, Dayane, Rosangela, Eduardo e Horacio, pelos momentos compartilhados, colaboração, amizade e apoio.

A Priscilia e Ricardo por me motivar para vir ao Brasil a realizar pesquisa, a Roberto, Ana Paula e Milan por sua amizade, apoio e carinho.

A meu Amor Alexandre, pelo apoio, paciência e compreensão durante o período de realização deste trabalho.

A tantos outros cuja quantidade de nomes seria demasiado para esta folha, cujo agradecimento e carinho ficam aqui registrados.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

Muito obrigada !!!

“Deus destina nossa vida de um jeito misterioso, curioso, de uma forma que não entendemos o porquê de cada coisa, mas chega um dia que começa a fazer sentido cada desafio, cada obstáculo e cada situação. Deus nos prepara, nos qualifica e nos ensina a dar valor antes de nos entregar qualquer Graça! Pois quem esta com ele sabe que nada é em vão!”

Victor Hugo de Oliveira

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - O microambiente normal e a tumorigênese.....	25
Figura 2 - Esquema representativo da sobrevivência e das vias apoptóticas mediadas por integrinas.....	29
Figura 3 - Diagrama esquematizando a estrutura dos domínios das SVMPs e as moléculas relacionadas.....	33
Figura 4 - Fotografias ilustrativas do procedimento experimental da avaliação da citotoxicidade endotelial e genotoxicidade em ovos embrionados.....	40
Figura 5 - Fluxograma do delineamento experimental para avaliação dos efeitos da jararagina <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	41
Figura 6 - Localização anatômica e número de glândulas mamárias em camundongos.....	48
Figura 7 - Avaliação da atividade hemorrágica da jararagina em membrana corioalantóide de ovos de galinha embrionados.....	54
Figura 8 - Viabilidade celular após tratamento com jararagina avaliado pelo teste colorimétrico MTT.....	56
Figura 9 - Aspecto morfológico da cultura de fibroblasto humano FN1 tratada com diferentes concentrações de jararagina por 24, 48 e 72 horas.....	58
Figura 10 - Aspecto morfológico da cultura da célula endotelial humana HUVEC tratada com diferentes concentrações de jararagina por 24, 48 e 72 h.....	59
Figura 11 - Aspecto morfológico da cultura de células de tumor de mama humano T47D tratadas com jararagina por 24, 48 e 72 horas.....	60
Figura 12 - Aspecto morfológico da cultura de células de tumor de mama humano MCF7 tratadas com jararagina por 24, 48 e 72 horas.....	61
Figura 13 - Aspecto morfológico da cultura de fibroblasto murino L929 tratadas com jararagina por 24, 48 e 72 horas.....	62
Figura 14 - Aspecto morfológico da cultura de células do TEA tratadas com jararagina por 24, 48 e 72 horas.....	63
Figura 15 - Aspecto citológico das células fibroblasto humano FN1 (A) e HUVEC (B) após tratamento com jararagina, avaliada pelo método de exclusão do azul de tripan.....	66
Figura 16 - Aspecto citológico das células do tumor de mama humano T47D	

após tratamento com jararagina, avaliada pelo método de exclusão do azul de tripan.....	67
Figura 17 - Aspecto citológico das células do tumor de mama humano MCF7 após tratamento com jararagina, avaliada pelo método de exclusão do azul de tripan.....	68
Figura 18 - Aspecto citológico das células do TEA e fibroblasto L929, após tratamento com jararagina, avaliadas pelo método de exclusão do azul de tripan..	70
Figura 19 - Quantificação de radicais livres poliinsaturados peroxidados (MDA) formados no sobrenadante das culturas das linhagens normais e tumorais tratadas com jararagina. Linhagens: FN1 (A), HUVEC (B), T47D (C), MCF-7 (D), TEA (E) e L929 (F).....	72
Figura 20 - Avaliação do ciclo celular em células de fibroblasto humano FN1 após 24 horas de tratamento com jararagina e grupo controle	74
Figura 21 - Avaliação do ciclo celular em células endoteliais humanas HUVEC após 24 horas de tratamento com jararagina e grupo controle.....	75
Figura 22 - Avaliação do ciclo celular em células do tumor de mama humano T47D após 24 horas de tratamento com jararagina e grupo controle.....	76
Figura 23 - Avaliação do ciclo celular em células do tumor de mama humano MCF-7 após 24 horas de tratamento com jararagina e grupo controle.....	77
Figura 24 - Formação de estruturas ductais em células tumorais de mama humana MCF7 após o tratamento com jararagina.....	78
Figura 25 - Avaliação do ciclo celular em células de fibroblasto murino L929 após 24 horas de tratamento com jararagina e grupo controle.....	79
Figura 26 - Avaliação do ciclo celular em células de Tumor de Ehrlich ascítico após 24 horas de tratamento com jararagina e grupo controle	80
Figura 27 - Expressão de marcadores de morte celular por apoptose (anexina-V) ou necrose (PI) em células de fibroblasto humano FN1 após 24 horas de tratamento com a jararagina e grupo controle.....	82
Figura 28 - Expressão de marcadores de morte celular por apoptose (anexina-V) ou necrose (PI) em células HUVEC após 24 horas de tratamento com a jararagina e grupo controle.....	83
Figura 29 - Expressão de marcadores de morte celular por apoptose (anexina-V) ou necrose (PI) em células T47D após 24 horas de tratamento com a	

jararagina e grupo controle.....	84
Figura 30 - Expressão de marcadores de morte celular por apoptose (anexina-V) ou necrose (PI) em células tumorais de mama MCF-7 após 24 horas de tratamento com a jararagina e grupo controle.....	85
Figura 31 - Expressão de marcadores de morte celular por apoptose (anexina-V) ou necrose (PI) em células de fibroblasto L929 após 24 horas de tratamento com a jararagina e grupo controle.....	86
Figura 32 - Expressão de marcadores de morte celular por apoptose (anexina-V) ou necrose (PI) em células tumorais TEA após 24 horas de tratamento com a jararagina e grupo controle.....	87
Figura 33 - Expressão da proteína citocromo c, Bcl-2, caspase-3 e TNFR1 por citometria de fluxo em cultura de células FN1 tratadas com jararagina nas concentrações de 600 e 2400 nM e grupo controle	88
Figura 34 - Expressão da proteína citocromo c, Bcl-2, caspase-3 e TNFR1 por citometria de fluxo em cultura de células HUVEC tratadas com jararagina nas concentrações de 600 e 2400 nM e grupo controle	89
Figura 35 - Expressão da proteína citocromo c, Bcl-2, caspase-3 e TNFR1 por citometria de fluxo em cultura de células T47D tratadas com jararagina nas concentrações de 600 e 2400 nM e grupo controle	90
Figura 36 - Expressão da proteína citocromo c, Bcl-2, caspase-3 e TNFR1 por citometria de fluxo em cultura de células MCF-7 tratadas com jararagina nas concentrações de 600 e 2400 nM e grupo controle.....	91
Figura 37 - Expressão da proteína citocromo c, Bcl-2, caspase-3 e TNFR1 por citometria de fluxo em cultura de células TEA tratadas com jararagina nas concentrações de 600 e 2400 nM e grupo controle.....	92
Figura 38 - Expressão da proteína citocromo c, Bcl-2, caspase-3 e TNFR1 em cultura de células L929 tratadas com jararagina nas concentrações de 600 e 2400 nM e grupo controle	93
Figura 39 - Variação do peso dos camundongos BALB/c portadores do TEA.....	94
Figura 40 - Captura de imagem MS FX PRO representativas de camundongos BALB/c após 3, 9 e 16 dias do desenvolvimento do tumor de Ehrlich ascítico.....	96
Figura 41 - Curva de sobrevivência dos camundongos BALB/c portadores do TEA tratados com a jararagina nas concentrações de 400, 800 nM e grupo controle...	97

Figura 42 - Aspectos morfológicos das células aderentes do peritônio de camundongo normal (A) e portadores do TEA (B).....	99
Figura 43 - Gráficos representativos do tipo <i>Dot plot</i> das células residentes peritoniais em camundongos normais (A) e portadores do TEA, após 7 (B) e 14 (C) dias de tratamento com jararagina e grupo controle	101
Figura 44 - Histogramas representativos do conteúdo de DNA obtido por citometria no TEA (R1) após 7 (A) e 14 (B) dias de tratamento com jararagina....	102
Figura 45 - Expressão dos receptores pró-inflamatórios IL-1R, IL-6R e CD44 em células do TEA de camundongos BALB/c, tratados com jararagina.....	104
Figura 46 - Expressão dos marcadores CD34 e VEGF-R1 em células do TEA em camundongos BALB/c, tratados e grupo controle.....	105
Figura 47 - Expressão da proteína P53 e caspase-3 fosforilada em células do TEA em camundongos BALB/c tratados com jararagina e grupo controle	106
Figura 48 - Expressão do potencial elétrico mitocondrial e citocromo-c nas células do TEA grupos controle e tratados com jararagina.....	107
Figura 49 - Expressão das vias de morte celular determinadas pela marcação com Anexina V/PI em células do TEA em camundongos BAL/c tratados com a jararagina e grupo controle	108
Figura 50 - Fotografias dos aspectos macroscópicos da necropsia em camundongos BALB/c portadores de TEA e camundongo normal-referência.....	112
Figura 51 - Gráfico de barras representando a média \pm dp do peso dos órgãos internos dos animais tratados com jararagina, grupo controle	113
Figura 52 - Aspecto citológico do TEA após tratamento com jararagina nas concentrações de 400 nM, 800 nM e grupo controle.....	115
Figura 53 - Efeito da jararagina no crescimento do tumor e peso dos animais portador do TES em camundongos BALB/c durante 49 dias	117
Figura 54 - Perfil hematológico dos camundongos BALB/c com TES tratados com jararagina 400 nM, 800 nM e grupo controle.....	119
Figura 55 - Fotomicrografia do esfregaço sanguíneo mostrando células tumorais metastáticas no 49° dia de tratamento com jararagina 400 nM.....	120
Figura 56 - Aspectos macroscópicos representativos após a necropsia em camundongos BALB/c portadores do TES implantado na 9ª glândula mamária abdominal direita, após 49 dias de tratamento com jararagina 400, 800 nM e	

grupo controle.....	122
Figura 57 - Aspectos macroscópicos dos linfonodos inguinais e retroperitoneais dos camundongos portadores do TES, após 49 dias de tratamento.....	123
Figura 58 - Peso dos órgãos internos dos animais portadores do TES tratados com jararagina, grupo controle e normal.....	124
Figura 69 - Aspecto morfológico das células do TES – porção periférica após digestão dos grupos controle (A) e tratado com jararagina (B e C).....	125
Figura 60 - Gráficos do tipo <i>Density Plot</i> adquiridos no citômetro de fluxo representativos das populações celulares presentes nas áreas medular (A) e periférica (B) do TES após 49 dias de tratamento com jararagina 400 e 800 nM, e grupo controle.....	126
Figura 61 - Histogramas representativos das fases do ciclo celular nas áreas medular (A) e periférica (B) dos tumores após 49 dias de tratamento.....	127
Figura 62 - Análise do potencial elétrico mitocondrial do TES dos grupos tratados com jararagina e grupo controle.....	128
Figura 63 - Fotomicrografia das amostras do TES dos grupos tratados com jararagina e controle, corados com hematoxilina-eosina.....	130
Figura 64 - Porcentagem da síntese de colágeno total no TES dos grupos tratados com jararagina e grupo controle.....	131
Figura 65 - Análise citológica: Picosirius-red e Tricrômico de Masson das amostras de TES dos grupos tratados com jararagina e controle.....	132
Figura 66 - Fotomicrografia dos parênquimas esplênico e hepático dos camundongos BALB/c portadores de TES dos grupos tratados com jararagina e controle.....	134
Figura 67 - Fotomicrografia dos linfonodos inguinais dos camundongos BALB/c portadores de TES grupos tratados com jararagina e controle.....	135
Figura 68 - Eletromicrografia das amostras do TES do grupo controle obtido por MEV.....	137
Figura 69 - Eletromicrografia das amostras do TES do grupo tratado com jararagina 400 nM, obtida por MEV.....	138
Figura 70 - Eletromicrografia das amostras do TES grupo tratado com jararagina 800 nM, obtida por MEV.....	139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores do IC ₅₀ das linhagens celulares tumorais e normais humanas e murinas após tratamento com jararagina.....	55
Tabela 2 - Viabilidade celular das linhagens celulares pelo método de exclusão do azul de tripan, após 24, 48 e 72 horas de tratamento com jararagina.....	65
Tabela 3 - Efeito da jararagina no ciclo celular após 24 horas de tratamento.....	73
Tabela 4 - Avaliação das proporções de células em apoptose ou necrose nas linhagens celulares após 24 horas de tratamento.....	81
Tabela 5 - Média ± dp do volume do TEA dos grupos controle e tratados com jararagina nas concentrações de 400 e 800 nM.....	95
Tabela 6 - Número de leucócitos (10 ⁶ /ml), eritrócitos (10 ⁹ /ml) e plaquetas (10 ⁶ /ml) de camundongos BALB/c portadores do TEA, após 7 e 14 dias de tratamento com jararagina e grupo controle.....	109
Tabela 7 - Contagem diferencial de leucócitos em camundongos BALB/c portadores do TEA, após 7 ou 14 dias de tratamento com jararagina e grupo controle.....	110
Tabela 8 - Avaliação do fluido ascítico de camundongos BALB/c portadores de TAE dos grupos controle e tratado com jararagina 400 e 800 nM.....	114
Tabela 9 - Número de leucócitos totais, eritrócitos e plaquetas de camundongos BALB/c portadores do TES, após 7, 14, 21, 28, e 49 dias de tratamento.....	118
Tabela 10 - Populações de células tumorais nas fases do ciclo celular nas porções medular e periférica do TES, grupos tratados com jararagina e controle.....	127

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
Bcl-2	do inglês <i>B-cell lymphoma 2</i>
CAPPesq	Centro de Análise e Pesquisa em humanos.
CD34	do inglês <i>Cluster of Differentiation 34</i>
CD44	do inglês <i>Cluster de of Differentiation 44</i>
CO₂	dióxido de carbono
CAFs	Fibroblastos ativados
DP	desvio padrão
ECD	Glutamato - Cisteína - Aspartato
FACScalibur	do inglês <i>Fluorescence Activated Cell Analyser – Becton e DicKinson</i>)
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FN1	Linhagem celular de fibroblasto humano normal
HE	hematoxilina-eosina
HUVEC	Células endoteliais do cordão umbilical humano (do inglês <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>)
IC₅₀	Concentração da toxina que inibe o crescimento de 50% das células
IL-1R	Receptor de interleucina 1
IL-6R	Receptor de interleucina 6
L929	Linhagem celular de fibroblasto murino normal
LPO	Lipoperoxidação
MCA	Membrana corioalantóide
MCF 7	Linhagem celular epitelial de mama humana, derivada de efusão pleural de adenocarcinoma
MDA	malondialdeído
MEC	matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	reagente 3-[(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide])
n	número de amostras analisadas

nM	nanomolar
nm	nanômetro
P53	Proteína citoplasmática encargada da manutenção do código genético
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PE	do inglês <i>Phycoerythrin</i>
PI	Iodeto de propídio (do inglês <i>Propidium Iodide</i>)
$\Delta\Psi_m$	Potencial elétrico da membrana mitocondrial.
RGD	Arginina-Glicina-Aspartato
Ro123	Rodamina 123
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês: <i>reactive oxygen species</i>)
rpm	rotações por minuto
RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBF	Soro bovino fetal
SVMPs	do inglês <i>Snake venom metalloproteinases</i>
T47D	Linhagem celular de carcinoma ductal de mama humana
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARs	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TEA	Tumor de Ehrlich ascítica
TES	Tumor de Ehrlich sólido
TNFR1	Fator de necrose tumoral (do inglês <i>tumor necrosis factor receptor 1</i>)
μg	microgramas
VEGF-R1	Receptor de fator de crescimento em células do endotélio vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Revisão da literatura	22
1.1.1 <i>A mama humana</i>	22
1.1.2 <i>Matriz extracelular (MEC)</i>	23
1.1.3 <i>Fibroblastos</i>	26
1.1.4 <i>Integrinas</i>	28
1.1.5 <i>Venenos de serpentes e experimentos em modelos de câncer</i>	32
1.1.6 <i>Jararagina</i>	34
1.1.7 <i>Tumor experimental de Ehrlich</i>	36
1.2 Objetivos	38
2 MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1 Veneno ofídico	39
2.1.1 <i>Avaliação da atividade hemorrágica da jararagina em membrana corioalantóide de embriões de galinha (MCA)</i>	39
2.2 Modelo experimental <i>in vitro</i>	42
2.2.1 <i>Cultura de células normais e tumorais</i>	42
2.2.2 <i>Condições de cultivo</i>	43
2.2.3 <i>Avaliação da Viabilidade celular pelo método MTT</i>	45
2.2.4 <i>Avaliação da Viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de tripan</i>	44
2.2.5 <i>Determinação de produtos da lipoperoxidação (LPO) pela quantificação de substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico</i>	44
2.2.6 <i>Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo</i>	45
2.2.7 <i>Análise de marcadores de morte celular anexina-V (Apoptose) /PI (Necrose)</i>	46
2.2.8 <i>Análise da expressão de marcadores por citometria de fluxo</i>	46
2.3 Modelo experimental <i>in vivo</i>	47
2.3.1 <i>Manutenção e implantação do tumor de Ehrlich</i>	47
2.3.2 <i>Protocolo de tratamento dos animais portadores do tumor de Ehrlich com a jararagina</i>	48
2.3.3 <i>Avaliação do crescimento do tumor e probabilidade de sobrevivência</i>	49

2.3.4 Análise do perfil hematológico.....	49
2.3.5 Análise do infiltrado inflamatório no TEA.....	50
2.3.6 Necropsia dos Animais (Lesões internas e Metástases).....	50
2.3.7 Análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo.....	51
2.3.8 Análise da expressão de marcadores por citometria de fluxo.....	51
2.3.9 Marcadores de Morte Celular Anexina-V (Apoptose)/PI (Necrose) em TEA.....	52
2.3.10 Análise do Potencial Elétrico Mitocondrial ($\Delta\psi_m$).....	52
2.3.11 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	52
2.3.12 Processamento e análise histopatológica.....	53
2.4 Análise dos resultados.....	53
3 RESULTADOS	54
3.1 Avaliação da atividade hemorrágica da jararagina na rede vascular da membrana corioalantóide (MCA) de embriões de galinha.....	54
3.2 Avaliações <i>in vitro</i> dos efeitos da jararagina em células normais e tumorais de adenocarcinoma mamário.....	55
3.2.1 Avaliação da citotoxicidade celular pelo método colorimétrico MTT	55
3.2.2 Avaliação das alterações morfológicas.....	57
3.2.3 Avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de tripan.....	64
3.2.4 Determinação de produtos da lipoperoxidação (LPO) por quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs).....	71
3.2.5 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo.....	73
3.2.6 Avaliação da expressão de marcadores em células normais e tumorais por citometria de fluxo.....	81
<u>3.2.6.1 Expressão de marcadores de apoptose (Anexina-V) e necrose (PI)</u>	81
<u>3.2.6.2 Expressão de marcadores celulares.....</u>	88
3.3 Avaliação <i>in vivo</i> dos efeitos da jararagina.....	94
3.3.1 Modelo experimental do Tumor de Ehrlich ascítico (TEA).....	94
<u>3.3.1.1 Peso dos animais e volume do tumor.....</u>	<u>94</u>
<u>3.3.1.2 Mortalidade dos camundongos BALB/c portadores do TEA tratados com jararagina.....</u>	<u>97</u>
<u>3.3.1.3 Análise das populações celulares, fases do ciclo celular e</u>	

<u>marcadores por citometria de fluxo.....</u>	98
<u>3.3.1.4 Análise dos marcadores/receptores de membrana e nucleares por citometria de fluxo.....</u>	103
<u>3.3.1.5 Análise do perfil hematológico.....</u>	109
<u>3.3.1.6 Análise das alterações em órgãos internos após necropsia dos animais portadores do TEA.....</u>	111
<u>3.3.1.7 Análise do fluido ascítico.....</u>	113
<u>3.3.2 Modelo experimental do tumor de Ehrlich sólido - ortotópico (TES).....</u>	116
<u>3.3.2.1 Determinação do volume tumoral e peso corpóreo.....</u>	116
<u>3.3.2.2 Perfil hematológico dos camundongos BALB/c portadores do TES....</u>	118
<u>3.3.2.3 Análise macroscópica dos tumores e órgãos internos após a necropsia dos animais portadores do TES.....</u>	121
<u>3.3.2.4 Análises das populações celulares e ciclo celular no TES por citometria de fluxo.....</u>	125
<u>3.3.2.5 Análise do Potencial Elétrico Mitocondrial ($\Delta\psi_m$) no TES.....</u>	128
<u>3.3.2.6 Análise histopatológico das amostras de TES.....</u>	129
<u>3.3.2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</u>	136
4 DISCUSSÃO.....	140
5 CONCLUSÃO.....	161
REFERÊNCIAS.....	162

1 INTRODUÇÃO

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

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

A classificação da doença é baseada tradicionalmente na histologia e estagio do tumor, sendo o 95% classificados como adenocarcinoma, os quais são divididos em carcinoma *in situ* e invasivo. O carcinoma de mama *in situ* representa de 15 a 20% das lesões, é subclassificado como ductal (80%) ou lobular (20%) sendo que padrões de crescimento e características citológicas formam a base para distinguir entre os dois tipos. Enquanto que, o carcinoma de mama invasivo representa de 80-85% das lesões, e compreendem um grupo heterogêneo de tumores diferenciados em subtipos histológicos. Os principais subtipos invasivos incluem ductal, lobular, ductal/lobular, colóide, tubular, medular e carcinoma papilar. Destes, o carcinoma ductal invasivo é o mais frequente subtipo, representando de 70-80% de todas as lesões invasivas (POLYAK, 2007).

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

O veneno de serpente são uma fonte biológica de diferentes peptídeos, enzimas e toxinas farmacologicamente ativas, que podem oferecer proteção contra o processo de carcinogênese, atuando como um agente único ou como adjuvante, representando fonte de valiosos compostos para intervenções terapêuticas

preventivas (BEVIGLIA; STEWART; NIEWAROWSKI, 1995; SON et al., 2007). A jararagina é uma proteína isolada do veneno da serpente *Bothrops jararaca* que apresenta domínios estruturais importantes nas funções biológicas, apresentando grande versatilidade e, portanto motivo de estudo.

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

1.1 Revisão da literatura

1.1.1 A glândula mamaria

A glândula mamaria é um órgão secretório complexo que é formado por um complexo sistema de ductos ramificados a partir do mamilo que se alargam para formar um saco (tecido glandular), envolvido por um denso estroma constituído de tecido adiposo e tecido conjuntivo fibroso, além de vasos sanguíneos, vasos linfáticos e linfonodos (SCHMITT; GOBBI, 2006).

O desenvolvimento da glândula mamária envolve o período embrionário, puberdade e adulto. No período adulto ocorrem os principais eventos do desenvolvimento da glândula mamária, incluindo uma rápida proliferação e diferenciação do epitélio luminal durante a gravidez acompanhada pela regressão após lactação. Hormônios e fatores de crescimento desempenham um papel importante em diferentes estágios do desenvolvimento mamário e também estão implicados no câncer de mama (WATSON; KHALED, 2008).

Na glândula mamaria adulta há dois tipos principais de compartimentos: o epitélio (luminal e basal) e o estroma. O epitélio luminal forma os ductos e os alvéolos secretores; enquanto o epitélio basal consiste essencialmente de células mioepiteliais. Estes dois tipos de epitélio formam uma estrutura bi-camada de epitélio simples que é incorporado ao estroma (WATSON; OLIVER; KHALED, 2011).

O estroma da glândula mamária esta formado por numerosos tipos de células, incluindo *stem cells* somáticas, fibroblastos, adipócitos, células endoteliais vasculares que formam os vasos sanguíneos, neurônios e uma variedade de células imunes, constituindo o microambiente da glândula mamária normal (HENNIGHAUSEN; ROBINSON, 2005).

Durante a carcinogênese, além das mutações genéticas, existe um desequilíbrio na troca dinâmica de informações entre as células e o microambiente, que envolve a progressão sequencial de estágios patológicos e clínicos bem definidos, começando com hiperproliferação epitelial e progredindo para carcinoma de mama. Considerando a complexa rede de interações e sinais que existem entre o estroma e o tumor, o microambiente tumoral é uma parte integral e essencial, e a necessidade de compreendê-lo tem crescido ultimamente.

1.1.2 Matriz extracelular (MEC)

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

A MEC também regula diretamente os fatores de crescimento. Fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), ligam-se a importantes moléculas da matriz, incluindo a heparina ou sulfato de heparina, componentes dos proteoglicanos, que atuam como reservatório de fatores de crescimento na MEC e facilitam os gradientes intersticiais, estabelecendo uma reposição de fatores de crescimento tecido específico em caso de lesões. Estas proteínas da MEC servem como cofatores importantes na apresentação de fatores de crescimento para os seus receptores específicos, como é o caso do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento transformante beta (TGF- β) (HYNES, 2009).

A comunicação entre as células e o seu microambiente ocorre por meio de uma rede complexa de sinais gerados pela adesão célula-MEC, célula-célula e

moléculas de junção, assim como pela colaboração entre os tipos de células epiteliais, estromais e outros tipos celulares órgão específico (BISSELL; HINES, 2011).

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

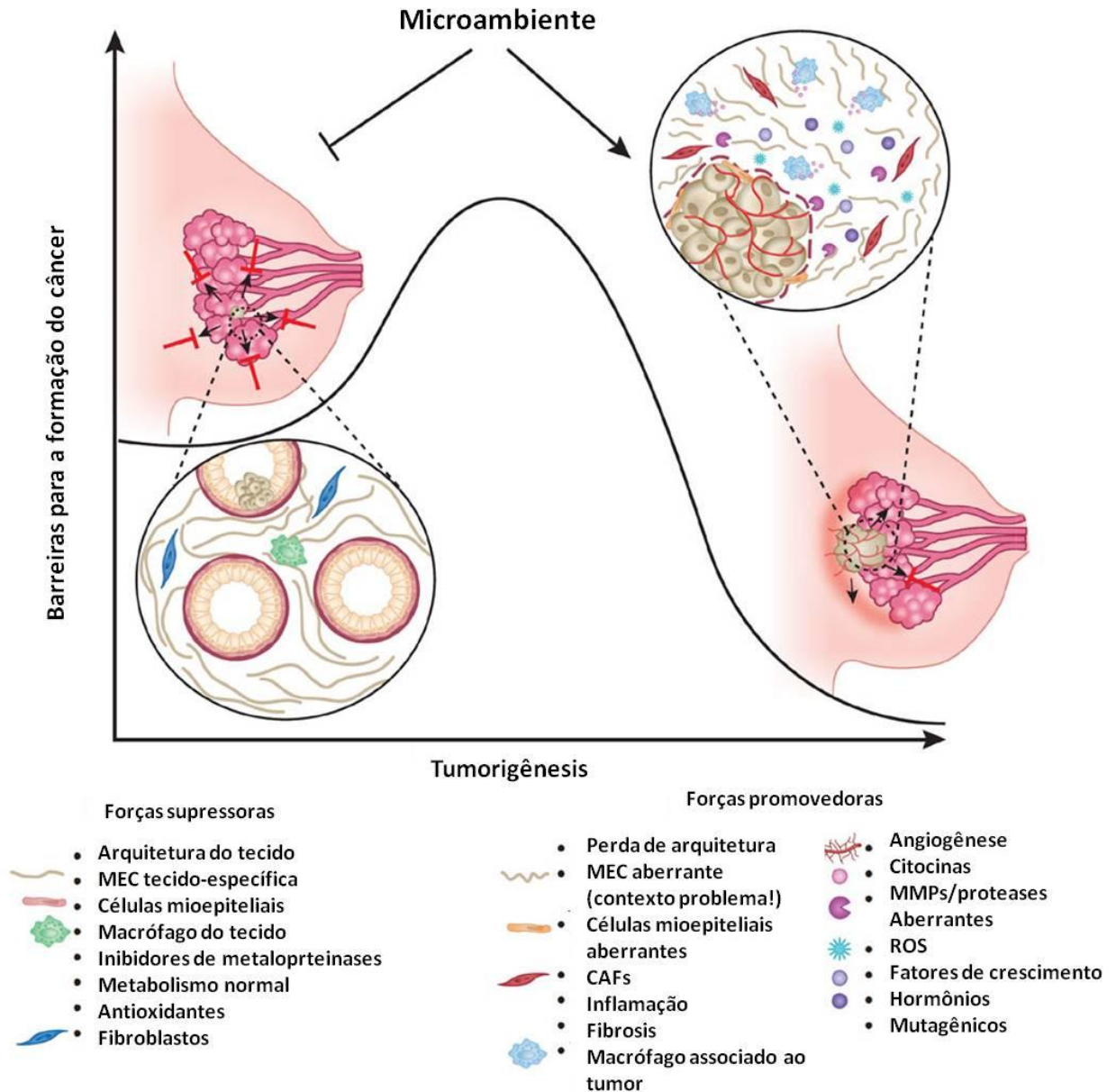
Estudos têm demonstrado que o estroma modifica o fenótipo epitelial. Com a idade, o complexo coletivo nomeado estroma (fibroblastos, vasculatura, células imunes e de ECM intersticial) muda gradualmente e, ao longo do tempo, torna-se tão alterada que é acumulado danos ao epitélio, mesmo em a ausência de qualquer susceptibilidade genética conhecida. Sinais do estroma e epitélio aberrante podem existir muito antes há carcinoma evidente, aumentando a densidade do estroma, de fato, o aumento da densidade do estroma se correlaciona com uma maior probabilidade de desenvolver câncer de mama (BOYD et al., 2007; SICKLES, 2007).

Evidências de tumores ocultos e a não progressão para câncer tem sugerido que o microambiente circundante do tumor, nestes casos, fornece sinalizações cruciais para manter a arquitetura dos tecidos, inibir o crescimento celular e suprimir ou reverter o fenótipo maligno, desde que a arquitetura e homeostasia do tecido estão essencialmente controladas (Figura 1 - inferior esquerda). No entanto, uma vez que a homeostasia é perdida, o microambiente alterado pode também ser permissivo para o crescimento do tumor, e a combinação de agentes mutagênicos, inflamação e fatores de crescimento, associados a forças promocionais (Figura 1 - superior direita) podem romper a barreira à formação de tumor, resultando em desenvolvimento do câncer (BISSELL; HINES, 2011).

Mesmo na ausência de sinais evidentes e visíveis a partir do estroma, as células epiteliais acumulam mutações, mudam de forma (atipia), perdem a polaridade e crescem no lúmen ductal para formar o carcinoma ductal *in situ*. O comprometimento da integridade da membrana basal ou camada mioepitelial permite que as células luminais estabeleçam contactos com os componentes da MEC, tais como o colágeno I. Por sua vez, isto conduz a sinais de polaridade aberrante, super-regulação de metaloproteinases da matriz (MMPs) que digerem as

proteínas do estroma, invasão e metástase (BISSELL; HINES, 2011; LITTLEPAGE; EGEBLAD; WERB, 2005).

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



Fonte: Bissell e Hines, 2011

No microambiente tumoral existe uma rede dinâmica e interligada de interações recíprocas que podem influenciar os processos de proliferação, migração, invasão e angiogênese. Acredita-se que as células epiteliais tumorais e componentes do estroma comunicam-se através da produção de fatores de

crescimento e citocinas. A comunicação é mediada pela estimulação tanto parácrina e autócrina por vários fatores de crescimento, tais como fator de crescimento transformante beta (TGF- β), fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e as interleucinas. Estes fatores de crescimento podem ser liberados a partir da MEC através da ação das proteases, tais como as metaloproteinases de matriz (MMPs), ou ser segregadas a partir de células do câncer e de fibroblastos activados (ZHANG; NIE; CHAKRABARTY, 2011).

A liberação de fatores de crescimento e outros fatores associados à sinalização, que recrutam as células derivadas da medula óssea (macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células estaminais mesenquimais) para o estroma associados aos fibroblastos que se tornam ativados e hiper-vascularização no tumor. A presença destes fatores de crescimento, juntamente com a remodelação da MEC e indução de neovascularização conduz a um microambiente tumoral que é favorável para o crescimento, progressão e metástase eventual do tumor e foi nomeado um estroma reativo. A indução de um estroma desmoplásico ou reativo é associado com um prognóstico desfavorável em vários carcinomas, incluindo o câncer de pâncreas, mama e colo-rectal (BISSELL; HINES, 2011; LITTLEPAGE; EGEBLAD; WERB, 2005). Por exemplo, as células de tumor muitas vezes liberam o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) para que as células do estroma que possuem receptores, em particular fibroblastos, miofibroblastos e macrófagos, retribuam liberando o fator de crescimento tipo insulina que beneficia o crescimento e sobrevivência das células cancerosas vizinhas (FRASCA et al., 2008).

1.1.3 Fibroblastos

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

remodelação da MEC pela produção de proteínas, e são imprescindíveis na manutenção da homeostasia do tecido epitelial pela secreção de fatores de crescimento e pela interação direta com a célula epitelial (WISEMAN; WERB, 2002).

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

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

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

Os fibroblastos ativados presentes em diferentes tumores sólidos, também conhecidos como fibroblastos associados a câncer (FACs) são funcionalmente e fenotipicamente distintos dos fibroblastos normais, sofrendo alterações na morfologia e no perfil de expressão, adquirindo um fenótipo semelhante a miofibroblastos dentro do microambiente do tumor (LI; FAN; HOUGHTON, 2007), e contribuem para o crescimento e progressão tumoral por permanecerem constantemente ativados e indicando a formação de estroma reativo. Estes

fibroblastos ativados têm muitas semelhanças com os fibroblastos em locais de cicatrização de feridas (BEACHAM; CUKIERMAN, 2005).

Evidências sugerem que os FAC são fundamentais para regular as interações dinâmicas e recíprocas que ocorrem entre as células malignas epiteliais, matriz extracelular, e as numerosas células não-cancerosas frequentemente encontrada dentro deste meio de tumor, incluindo células endoteliais, adipocitos, células inflamatórias e imunes. FAC têm sido implicados em quase todas as fases de iniciação, progressão para metástase, e tem mostrado aumentar a proliferação de células epiteliais, a tumorigenicidade, angiogénese e o potencial metastático de células tumorais em relação à seu fibroblasto normal (BEACHAM; CUKIERMAN, 2005; EREZ et al., 2010).

1.1.4 Integrinas

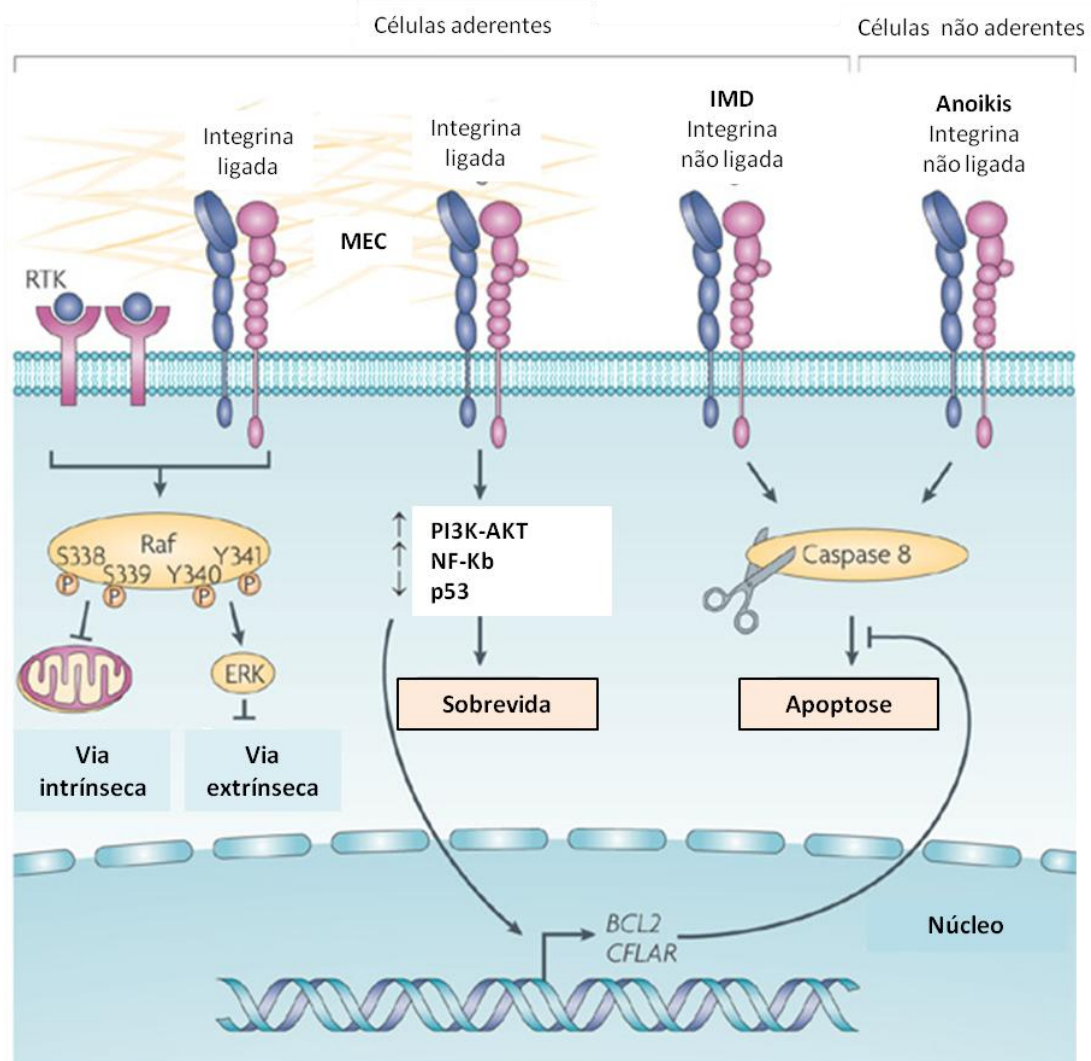
As integrinas são glicoproteínas heterodiméricas, que apresentam as subunidades α e β associadas não covalentemente, com diferentes combinações de $\alpha\beta$ fornecendo ligação e sinalização específica (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999). São descritas pelo menos 18 subunidades α e 8 subunidades β , com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

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

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

As sinalizações conjuntas entre os receptores de fator de crescimento e integrinas ativa Raf conduzindo a mecanismos distintos de sobrevivência celular. Sinalizações através de integrina $\alpha\beta_3$ e o receptor do fator de crescimento de fibroblastos promove a fosforilação de Ser338 e Ser339 da Raf, protegendo as células da via intrínseca da apoptose, integrina $\alpha\beta_5$ e o receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 fosforilam Tyr340 e Tyr341 da Raf, para prevenir a apoptose através da via extrínseca (FRISCH; SCREATON, 2001).

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



Fonte: Desgrosellier e Cheresh, 2010.

Em células aderentes em que muitas das integrinas estão sem ligação, estas iniciam a clivagem da caspase 8, desencadeando a apoptose através da integrina mediada por morte (IMD). Na perda completa de adesão, a morte celular é iniciada

através de um processo denominado anoikis. A apoptose induzida por anoikis pode prosseguir tanto através das vias intrínseca e extrínseca (FRISCH; SCREATON, 2001).

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

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

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

A expressão de integrinas nas células epiteliais mamárias é regulada espacial e temporalmente durante o desenvolvimento da glândula mamaria (gravidez, lactação, e involução). A célula epitelial mamaria é dependente de ancoragem e requer interações célula-célula ou de ligação mediada por integrina para a MEC, na ausência de adesão, as células não proliferam em resposta a fatores de crescimento e sofrem uma forma especializada de apoptose por anoikis. Embora a expressão de integrinas e a sua ativação pode variar dentro da glândula, um conjunto limitado de integrinas são expressas nas células luminais. Assim, as células epiteliais da glândula mamária expressam pelo menos oito receptores de integrina funcionais incluindo receptores de colágeno ($\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_1$), receptores de laminina ($\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ e $\alpha_6\beta_4$) e integrinas ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$) que reconhecem sequências RGD presentes

em moléculas de MEC determinadas como a fibronectina e vitronectina (LAMBERT; OZTURK; THIAGALINGAM, 2012).

No entanto, a expressão da integrina podem também variar consideravelmente entre o tecido normal e tumoral. Os níveis de expressão da integrinas $\alpha_2\beta_1$, diminui em células tumorais, aumentando potencialmente a disseminação da célula tumoral. Assim, a re-expressão de $\alpha_2\beta_1$ em células de câncer de mama diminui algumas das propriedades malignas, o que sugere que $\alpha_2\beta_1$ poderia funcionar como um supressor de tumor. A correlação dos níveis de expressão de integrinas em tumores humanos, com resultados patológicos, como a metástase, identificaram várias integrinas que podem ter um importante papel na progressão do câncer (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010).

Os estudos em câncer de mama suportam a colaboração das integrinas com a sinalização dos fatores de crescimento durante a tumorigênese *in vivo* e, a participação ativa no processo de iniciação do tumor. A discrepância entre os estudos e as supressão da integrina β_1 e β_4 sugere que as integrinas podem utilizar vias de sinalização distintas em diferentes momentos durante a tumorigênese para regular tanto a iniciação do tumor e o crescimento tumoral (LAMBERT; OZTURK; THIAGALINGAM, 2012).

Varias classes de integrinas reconhecem a sequencia RGD (Arginina-Glicina-Asparagina) em proteínas da MEC, esta sequência RGD é distribuída em uma grande variedade de proteínas de adesão, constituindo o principal sistema de reconhecimento pelas integrinas (RUOSLAHTI, 1996).

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

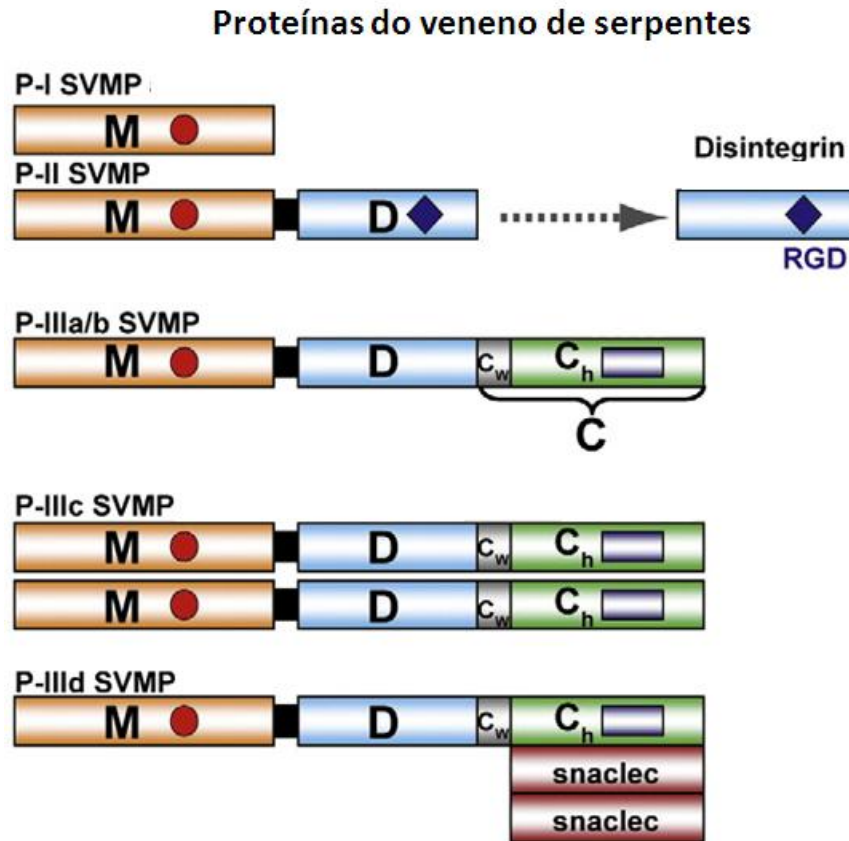
1.1.5 Venenos de serpentes, experimentos em modelos de câncer.

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

Os venenos de serpente têm sido amplamente investigados há anos, na busca do isolamento de seus componentes ativos que participam nos processos biológicos, tais como adesão, migração, proliferação, angiogênese, agregação plaquetária, entre outros, identificando-se dois tipos principais de proteases, classificadas de acordo a sua estrutura, como as serinoproteases e as metaloproteases.

As Metaloproteases de Veneno de Serpentes (**Snake Venom Metalloproteinases - SVMs**) são organizados em classes baseado na presença de domínios estruturais, sendo classificadas em três classes: A classe P-I esta composta por enzimas que contém só o domínio metaloproteinase (M), a classe P-II composta por domínio M e domínio desintegrina (D), e P-III que contem os domínios M, D e rico em cisteína (C) (FOX; SERRANO, 2005, 2008) como mostrado na figura 3. A classe PIII é subdividida em subclasses, baseadas nas distintas modificações pós-traducionais, tais como homodimerização (P-IIIc), ou proteólise entre o domínio M e D (P-IIIb), presença de um domínio adicional lectina-c-like (P-IIId) derivado de uma modificação pós-traducional da classe padrão P-III (P-IIId) das SVMs (CLEMETSON; MORITA; MANJUNATHA, 2009).

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



Fonte: Clemetson et al., 2009

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

Várias toxinas de venenos de serpentes inibem a adesão de células tumorais, migração e a formação de metástase em modelos experimentais. As atividades de diversas desintegrinas, como a albolabrin e a eristostatin (*Eristocophis macmahoni*) têm mostrado efeitos na perda da adesão das células de melanoma murino às proteínas da MEC, como fibronectina, laminina e vitronectina).

Células de melanoma maligno murino e melanoma humano MV3 pretratadas com eritrostatina diminuíram o número de metástases no fígado e pulmão (BEVIGLIA; STEWART; NIEWIAROWSKI, 1995; MORRIS et al., 1995), provavelmente ao fato da ligação da eritrostatina a receptores integrina $\alpha_4\beta_1$, altamente expressas em células metastáticas (DANEN et al., 1998). O pré-tratamento das células B16F10 com salmosina (*Agkistrodon halys brevicaudus*) inibe a proliferação e os efeitos metastáticos no parênquima pulmonar, atribuído à ligação da integrina $\alpha_v\beta_3$ na superfície das células tumorais (KANG et al., 2000).

Rodostomina (*Calloselasma rhodostoma*) em células endoteliais (HUVEC) inibe a migração, invasão e formação de tubos em matrigel induzida pelo fator de crescimento de fibroblastos. No melanoma B16F10 tratados pela via subcutânea com rodostomina, apresentaram aumento da taxa de sobrevivência (YEH et al., 2001). Jararagina-C de *Bothrops jararaca* inibe a agregação plaquetária e a adesão das células ECV-304, endoteliais HUVEC e células transfectadas com a integrina $\alpha_2\beta_1$, ao colágeno tipo I (MOURA-DA-SILVA; MARCINKIEWICZ; NIEWIAROWSKI, 2001).

A contortrostatina (*Agkistrodon contortrix contortrix*), uma desintegrina homodimérica que apresenta a sequência RGD, *in vitro* inibe a interação das integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, e/ou $\alpha_5\beta_1$ presentes em células tumorais e endoteliais. *In vivo* mostrou potente atividade antitumoral e antiangiogênica no modelo de xenoinxerto ortotópico de tumor de mama humano - MDA-MB-435 (ZHOU et al., 2000). A formulação liposomal com contortrostatina (LCN) via intravenosa e intratumoral em modelo ortotópico de xenoinxerto de câncer de mama MDA-MB-435 e câncer de ovário A2780 aumenta significativamente o tempo de meia-vida da CN, quando comparada à proteína não encapsulada (SWENSON et al., 2004).

Em 2007, Son e colaboradores mostraram que o tratamento com o veneno de cobra *Viverra lebetina turanica*, inibe o crescimento de células de tumor de próstata andrógeno independentes PC-3 e DU145, provavelmente pela inibição do fator nuclear NF- κ B, e assim induz a morte celular por apoptose, e aumenta a expressão de proteínas pro-apoptóticas como p53, Bax e caspase-3.

1.1.6 Jararagina

A jararagina, purificada do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, família Viperidae, é uma metaloprotease zinco-dependente, pertencente à família

Reprolisina (PAINE et al., 1992). Apresenta 52 kDa e estruturalmente pertence à classe P-III das SVMPs, apresentando o domínio metaloproteinase, seguido dos domínios tipo desintegrina e rico em cisteína. A jararagina é um dos principais componentes do veneno, responsáveis pela hemorragia local e sistêmica do veneno, apresentando atividade proteolítica sobre a MEC e componentes da membrana basal dos capilares, e proteínas plasmáticas importantes na hemostasia. Além de inibir a agregação plaquetária estimulada pelo colágeno tipo 1 via integrina $\alpha_2\beta_1$, também inibe os eventos de sinalização intracelular mediados pelo colágeno (KAMIGUTI; HAY; ZUZEL, 1996; MOURA-DA-SILVA et al., 2001).

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

A jararagina tem sido muito utilizada por diferentes grupos de pesquisa no Brasil e em outros centros internacionais. Demonstrou-se que a jararagina (50 $\mu\text{g/mL}$) induziu a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) em células residentes do peritônio de camundongos (CLISA et al., 2001); camundongos deficientes em receptores TNF e IL-6 mostraram a importância destes no desenvolvimento de necrose induzida pela jararagina (LAING et al., 2003).

A inoculação da jararagina no tecido subcutâneo dorsal de camundongos estimula o influxo de células inflamatórias, dependendo do tempo e da dose, caracterizada por infiltrado de leucócitos, predominantemente de neutrófilos (COSTA et al., 2002).

A administração semanal em camundongos de doses sub-letais, a jararagina provoca significativa leucopenia, aumento de mastócitos e de eritrócitos na fase inicial, mas não causa hemorragia ou inflamação (MARIA; VASSÃO; RUIZ, 2003). Em concentrações 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$ mostrou diminuição da viabilidade celular e efeitos

inibitórios na adesão ao substrato em células endoteliais (TANJONI et al., 2005), células de melanoma SKmel-28 e fibroblastos normais (CORREA et al., 2002; KLEIN et al., 2011). A Jararagina em baixas concentrações (1,25; 2,5 e 5 µg/mL) estimula a disseminação, o crescimento de células de neuroblastoma, efeitos acompanhados pelo desarranjo do citoesqueleto, aumento na polimerização de actina e formação de filopodios e lamelipodios associados à motilidade celular (COSTA et al., 2008).

A atividade proteolítica da jararagina causa efeitos pró-inflamatórios pela migração de leucócitos em bolha de ar em camundongos. Em camundongos a jararagina causou significativas lesões hemorrágicas no pulmão de maneira dose dependente, após 1 e 3 horas de inoculação. Interessantemente, após 24 horas a intensidade das regiões hemorrágicas foi menor quando comparada a áreas coletadas em tempos menores de 30 minutos (COSTA et al., 2002).

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

1.1.7 Tumor Experimental do adenocarcinoma de mama de Ehrlich

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

O tumor de Ehrlich foi descrito como um adenocarcinoma de mama murino espontâneo, originário de células epiteliais de carcinoma mamário, e foi utilizado como tumor experimental pelo transplante subcutâneo entre camundongos. Posteriormente, foi descrita a forma ascítica do tumor, desenvolvido no peritônio dos camundongos, e nomearam-o como carcinoma ascítico de Ehrlich pela presença de

líquido ascítico junto com as células de carcinoma. O carcinoma ascítico de Ehrlich foi disseminado rapidamente nos institutos de pesquisa pela vantagem de conter células tumorais homogêneas e livres, com a possibilidade de padronização do número de células ser transplantáveis quantificação do crescimento e estudo da biologia da célula tumoral (DAGLI, 1989; OZASLAN et al., 2011).

O carcinoma de Ehrlich se desenvolve com duas variáveis de comportamento: a forma ascítica (TEA), quando as células são inoculadas via intraperitoneal, e a forma sólida (TES) quando inoculadas via subcutânea. Este tipo de tumor pode ser transplantado para qualquer linhagem de camundongo por apresentar inespecificidade, provavelmente devido à perda da expressão do antígeno de histocompatibilidade H2 (CHEN; WATKINS, 1970).

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

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

Na análise histológica do tumor de Ehrlich observam-se células com alto grau de atipia (anaplasia), caracterizadas por nucléolos evidentes e numerosos, cromatina condensada, mitoses atípicas ou aberrantes e relação núcleo-citoplasma maior que o das células normais. O estroma é constituído por fibras colágenas e capilares neoformados (DAGLI, 1989). Donenko em 1992 mostrou que o fluido

ascítico conjuntamente dializado com células de tumor de Ehrlich, apresentam efeito protetor *in vivo* nas células tumorais do TEA e teratoma T-36, aumentando a porcentagem da taxa de crescimento.

O tumor de Ehrlich é utilizado como modelo para diversos estudos como metástases disseminadas por via linfática, para verificar a influência de drogas anti-angiogênicas e citotoxicidade, antiinflamatórias, hormônios sexuais (DAGLI; GUERRA; SALDIVIA, 1992; SILVA et al., 2002), e na forma ascítica possui uma semelhança com os tumores humanos sensíveis a quimioterapia, pelo fato de ser um tumor indiferenciado com rápida taxa de crescimento.

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

1.2 Objetivo

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

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Veneno ofídico

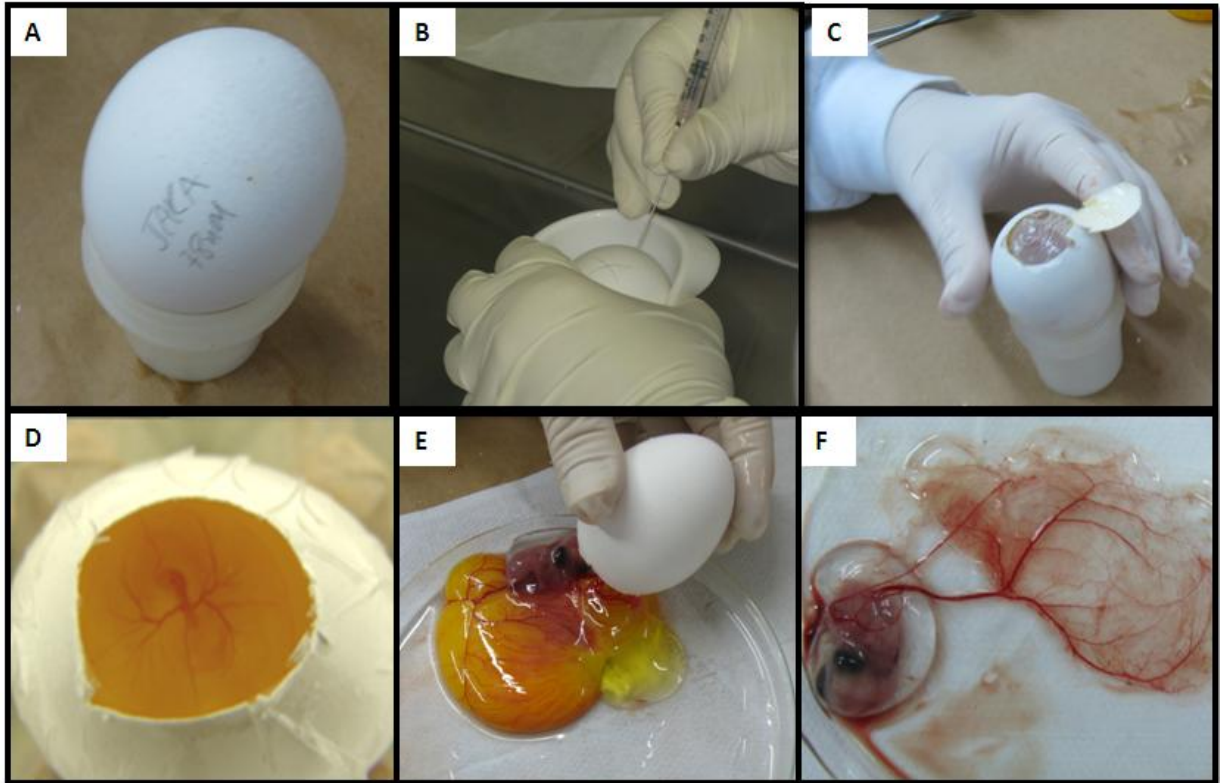
A jararagina, cedida gentilmente pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, foi isolada a partir do veneno de *Bothrops jararaca*, seguindo o procedimento descrito por Paine et al. (1992). A determinação da concentração proteica das amostras isoladas foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976) e as densidades ópticas obtidas pela leitura no espectrofotômetro a 595 nm (Thermoplate TP - Reader). A jararagina foi estocada em volume de 100 µL e armazenada a -20 °C até o momento de sua utilização. Nos experimentos *in vitro* a jararagina foi diluída em meio de cultura sem soro fetal bovino para aplicação nas culturas celulares ou diluída em solução salina (NaCl 0,15 M) para a inoculação *in vivo*, ajustando as concentrações requeridas.

2.1.1 Avaliação da atividade hemorrágica da jararagina em membrana corioalantóide de embriões de galinha (MCA)

A MCA de embrião de galinha é uma estrutura extra-embrionária que se forma da fusão da camada mesodermal da córion com a camada mesodermal da alantóide. Enquanto a MCA está em formação, em um processo que dura de 4 a 10 dias, uma rica rede vascular que se conecta a circulação embrionária por veias e artérias é desenvolvida (CIMPEAN; RIBATTI; RAICA, 2008).

Foram utilizados seis ovos fertilizados de galinha (*Gallus gallus domesticus*) mantidos em incubadora a 37,9 °C e umidade relativa do ar de 60%. No quarto dia de embriogênese foi realizado um furo na casca dos ovos para o acesso à membrana corioalantóide e com uma seringa tipo tuberculina foram inoculados 50 µL de jararagina nas concentrações 400, 800 nM ou água destilada no grupo controle. O lugar de inoculo foi fechado com fita adesiva e assim os ovos voltaram à incubação, sendo todo o procedimento realizado em cabina de fluxo laminar. Após 7 dias de incubação os embriões foram sacrificados por congelamento a 0 °C, e abertos para visualização da formação da rede vascular endotelial da membrana (Figura 4).

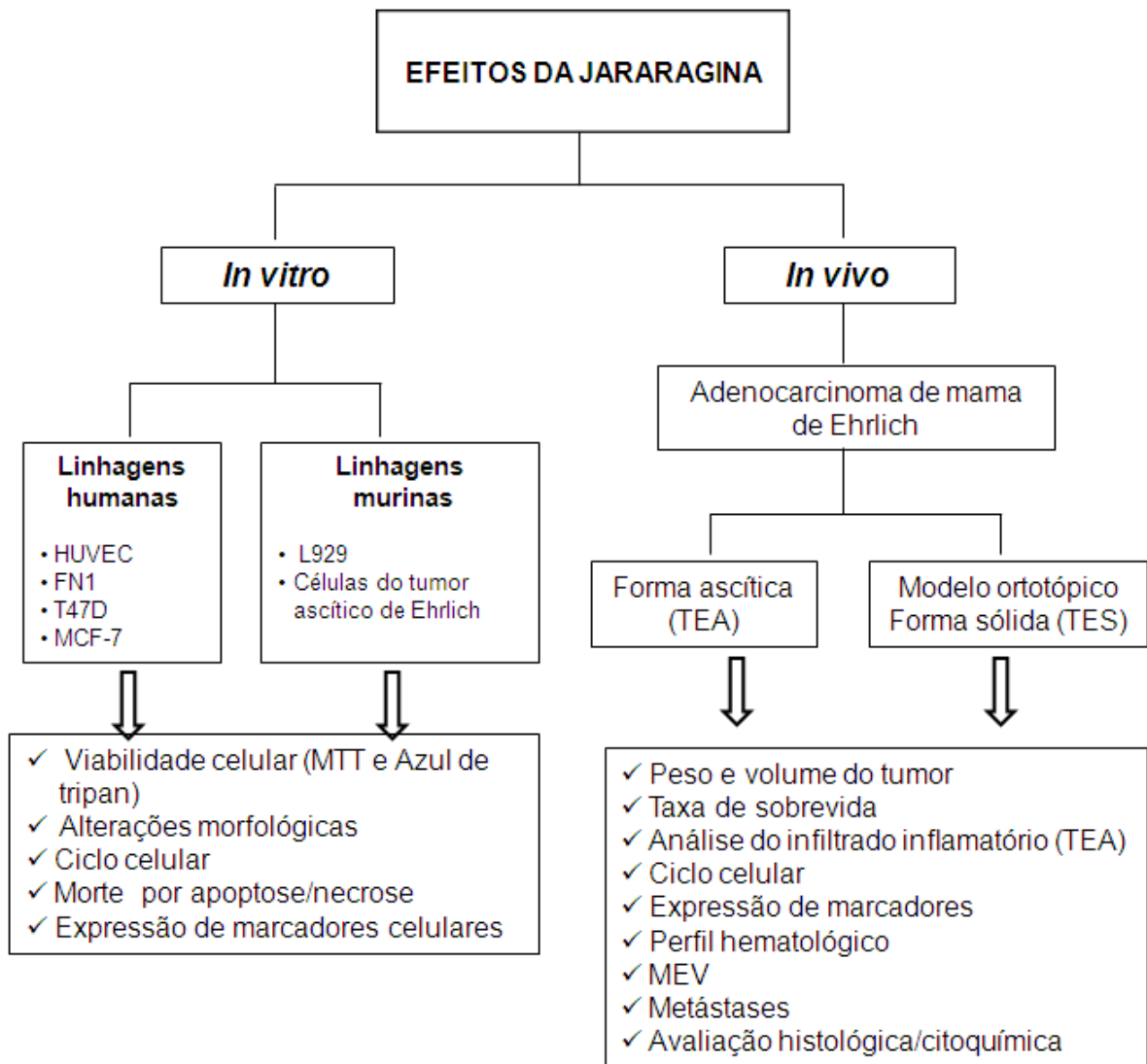
Figura 4 - Fotografias ilustrativas do procedimento experimental da avaliação da citotoxicidade endotelial e genotoxicidade em ovos embrionados.



(A) acondicionamento do ovo em suporte com a câmara aérea em posição superior; (B) inoculação da toxina; (C) abertura da câmara aérea superior após 7 dias de incubação; (D) observação do embrião viável com detalhe para a rede vascular (E) exposição do embrião e membranas embrionárias; (F) detalhe do embrião, saco vitelino e rede vascular.

Após a determinação da atividade hemorrágica da jararagina avaliada na MCA, o delineamento experimental foi estabelecido como está apresentado na figura 5. No modelo *in vitro* foram utilizadas linhagens celulares de adenocarcinoma mamário humano e murino, além de células normais. Nos experimentos *in vivo* foram utilizadas células de adenocarcinoma mamário murino de Ehrlich na forma ascítica e modelo ortotópico na forma sólida.

Figura 5 - Fluxograma do delineamento experimental para avaliação dos efeitos da jararagina *in vitro* e *in vivo*.



2.2 Modelo experimental *in vitro*

2.2.1 Cultura de células normais e tumorais

Foram utilizadas as seguintes linhagens celulares: FN1 fibroblasto humano normal, HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*)- célula endotelial humana, MCF7 células epiteliais de carcinoma mamário humano, T47D células de carcinoma ductal de mama humana, L929 fibroblasto proveniente do tecido conectivo subcutâneo de camundongo e células de adenocarcinoma mamário murino de Ehrlich.

Os fibroblastos humanos, provenientes de fragmentos da derme normal humana, foram estabelecidas pelo Dr. Durvanei Augusto Maria, no projeto de pesquisa nº 921/06 aprovado pela CAPPesq, realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HCFMUSP, posteriormente denominadas como FN1. As linhagens celulares de câncer de mama humano MCF-7 (ATCC HTB-22), T47D (ATCC HTB-133), célula endotelial humana HUVEC (ATCC CRL-1730) e fibroblasto murino L929 (ATCC CCL-1) foram adquiridas pela ATCC (*American Type Culture Collection*). As células de adenocarcinoma mamário murino de Ehrlich foram obtidas de camundongos portadores da forma ascítica do tumor, gentilmente doadas pelo Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-IV) da Universidade de São Paulo.

2.2.2 Condições de cultivo

As linhagens celulares FN1, HUVEC e L929 foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco, BRL), enquanto as linhagens de células de mama humana T47D e MCF-7 foram cultivadas em meio Dulbecco modificado – DMEM (Cultilab, Campinas, SP, Brasi). Os meios foram suplementados com: 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado - (Cultilab), 2 mM de L-glutamina, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, antibióticos penicilina/estreptomicina, ajustados a pH 7,2. As culturas foram expandidas em garrafas de cultura de 75 cm² e mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Após atingirem a sub-confluência celular e se encontrarem em fase exponencial de crescimento (2^a e 3^a passagem), as células foram removidas pela ação do tratamento com tripsina/EDTA (Gibco, USA),

ressuspensas em meio completo de cultura e semeadas nas placas de cultura (Corning Inc, Nova Iorque, EUA) na concentração adequada.

As células de carcinoma de mama murina, foram obtidas a partir de camundongos portadores de tumor de Ehrlich forma ascítica (TEA). Brevemente, o líquido ascítico foi coletado por punção abdominal com seringa e lavado três vezes em PBS estéril pH 7,4 (Tampão fosfato de salino) a 1800 rpm por 5 minutos, em sequência o botão celular foi resuspendido em meio RPMI-1640 e incubado em garrafas de cultura a 37 °C por 3 horas para aderência dos outros tipos celulares residentes no peritônio (fibroblastos, macrófagos e outros). Após este período, as células tumorais contidas no sobrenadante foram coletadas, a concentração e viabilidade celular foram determinadas pela contagem em câmara Neubauer pelo método de exclusão do azul de tripan. Células com viabilidade superior a 95% foram ajustadas para a concentração necessária, segundo o teste a ser realizado, e cultivadas nas placas de cultura.

2.2.3 Avaliação da Viabilidade celular pelo método colorimétrico MTT

A viabilidade celular das linhagens celulares tratadas com Jararagina foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-1)2,5-difenil tetrazólio brometo], descrito por Mosmann em 1983. Esta metodologia baseia-se na medição da atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase que reduz o reagente MTT a cristais de formazam. Estes cristais são quantificados espectrofotometricamente e possuem relação diretamente proporcional às células com metabolismo da cadeia respiratória intacta, detectando as células metabolicamente ativas.

Para cada linhagem, 100 µL da suspensão celular (10^5 células/mL) foram distribuídas em placas de fundo plano de 96 poços e mantidas a 37 °C com 5% de CO₂. Após 24 horas, o meio de cultura foi retirado e as células foram tratadas com 100 µL de jararagina nas concentrações finais de 75, 150, 300, 600, 1200 e 2400 e 4800 nM em quintuplicata. Os poços controles receberam 100 µL de meio de cultura. Para as células de tumor de Ehrlich, 90 µL da suspensão celular (2×10^5 células/mL) foram distribuídos nos poços da placa, juntamente com 10 µL da jararagina para obtenção das concentrações finais, descritas anteriormente. Após 24, 48 e 72 horas de tratamento, o sobrenadante das culturas foi removido cuidadosamente com a

adição de 20 µL de MTT (5 mg/mL) em cada poço e incubadas por 3 horas a 37 °C. Os cristais de formazan foram solubilizados pela adição de 40 µL de DMSO por poço e a absorbância foi quantificada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. A média da leitura do controle foi considerada como 100% de viabilidade celular, sendo comparada com a média de cada tratamento com jararagina para a determinação da porcentagem de células viáveis. Em cada linhagem celular foi determinada a concentração inibitória 50% (IC₅₀), após 24, 48, e 72 horas de tratamento. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes.

O aspecto morfológico das culturas, após o tratamento com a jararagina, foi observado no microscópio invertido (CARL ZEIS, JENA, BRL.) em aumento de 100X e registrado com auxílio de uma câmara Nikon 10.0 megapixels.

2.2.4 Avaliação da Viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de tripan

As células foram cultivadas e tratadas segundo o procedimento descrito na seção 2.2.3. Após o tratamento com a jararagina por 24, 48 e 72 horas, as células aderentes e do sobrenadante foram homogeneizadas com auxílio de uma pipeta e 20 µL desta suspensão misturada com 20 µL de azul de tripan (0,4%). O aspecto celular foi observado em microscópio óptico (CARL ZEIS, BRL) em aumento de 400X, enquanto a porcentagem da viabilidade celular e formação de agregados celulares foram visualizadas e contadas em câmara de Neubauer como a média de cinco poços por cada concentração.

2.2.5 Determinação de produtos da lipoperoxidação (LPO) pela quantificação de substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARs)

A avaliação da peroxidação lipídica (LPO) foi realizada seguindo a técnica de Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979), baseada na quantificação da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), principalmente o malondialdeído (MDA). Após 24 horas de incubação das células com a Jararagina, os sobrenadantes das culturas celulares foram recolhidos numa placa e mantidos a -20 °C até o dia do processamento. As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente, em microtubo e adicionada 40 µL de uma amostra com 200 µL de ácido tricloroacético 1,2 M (TCA), em outro microtubo 40 µL da mesma amostra foi

adicionada com 200 µL de TBA 0,059 M. Os microtubos foram colocados em banho-maria fervente (100°C) durante 20 minutos seguido de resfriamento a 0 °C em banho de gelo por 20 minutos. Finalmente, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 4 min. Alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram utilizados para quantificação das TBARs pela leitura no espectrofotômetro a 535 nm. A peroxidação lipídica foi calculada subtraindo a absorbância da série de TCA da série de TBA/TCA e dividindo pelo coeficiente de extinção molar do malondialdeído (MDA), sendo o valor expressado em nanomoles de MDA por mililitro de sobrenadante da cultura (MDA nM/mL).

$$LPO = \frac{\text{Valor obtido na série TBA/TCA} - \text{Valor obtido na série TCA}}{0,0312 \text{ (coeficiente molar de malondialdeído)}}$$

2.2.6 *Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo*

As células foram cultivadas na concentração de 5×10^5 células em placas de Petri de 35 mm, meio de cultura com 10% SBF e incubadas a 37 °C por 24 horas. O sobrenadante foi retirado e as células tratadas com jararagina nas concentrações de 600 e 2400 nM e não tratado como grupo controle, sendo cada tratamento realizado em triplicata. Após 24 horas de tratamento, as células do sobrenadante e as aderentes foram transferidas para tubos de centrifuga e a suspensão celular centrifugada a 1200 rpm por 5 minutos, o botão celular foi resuspenso em PBS e lavado duas vezes.

Para a avaliação das fases do ciclo celular, as células foram fixadas em 1 mL de etanol gelado 70% e estocadas a -20 °C. No dia da análise, as células foram novamente centrifugadas, e o botão celular resuspenso em solução contendo 200 µL de tampão FACSFlow, 20 µL de RNase-A (10 mg/mL) e 20 µL de solução de iodeto de propídeo (20 mg/mL). A solução foi cuidadosamente agitada e deixada protegida da luz no gelo por 1 hora, centrifugado a 3000 rpm, filtrada em membrana de nylon (Mesh-30), e o conteúdo do DNA analisado no citômetro de fluxo FACSCalibur (*Fluorescence Activated Cell Analyser – Becton e Dickinson, USA*) no canal de fluorescência FL2, pelo programa *CellQuest*, e em média 10000 eventos adquiridos. Os resultados foram expressos em porcentagem de células distribuídas

nas diferentes fases do ciclo celular: G0/G1, S, G2/M e células sub-haploides (Sub-G1).

2.2.7 Análise de marcadores de morte celular anexina-V (Apoptose) /PI (Necrose)

As células tratadas como descrito na seção 3.2.6 foram ressuspensas em tampão de ligação anexina-V (HEPES/NaOH 10 mM, pH 7,4; NaCl 140 mM; CaCl₂ 2,5 mM) e, em seguida incubadas com 5 µL de Iodeto de Propídeo (PI) 20 µg/mL e 1 µg de Anexina-V/FITC em temperatura ambiente por 30 minutos. A detecção da fluorescência emitida pelo fluorocromo FITC foi realizada por citometria de fluxo após excitação a 488 nm, nos canais de fluorescência FL1 (Anexina-V) x FL2 (PI). Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.2.8 Análise da expressão de marcadores por citometria de fluxo

Após o tratamento das células como descrito na seção 2.2.6, as células foram fixadas em tampão FACSFlow com paraformaldeído (2,5%) por 1 hora e as membranas permeabilizadas com Triton X-100 (0,1%), por 30 minutos a 4 °C. As suspensões celulares foram lavadas e resuspensas em tampão FACS flow e adicionado 1 µg do anticorpo primário específico para o marcador: anti-citocromo c, anti-Bcl 2 (*B cell lymphoma 2*), (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, EUA) e anti-caspase-3 (Abcam). Na avaliação do receptor de superfície envolvido na angiogênese VEGF-R1 (Vascular endothelial growth factor receptor 1) foi adicionado 1 µg do anticorpo específico (Abcam) sem a permeabilização da membrana. Após 1 hora de incubação, as células foram centrifugadas 1500 rpm por 10 minutos, e adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (Alexa-Fluor® 488 – Invitrogen) e incubado por mais 1 hora a 4 °C protegidos da luz. Após a ligação específica dos anticorpos, as células foram lavadas e resuspensas em 200 µL de tampão FACSFlow. A aquisição da expressão do marcador foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur em canal de fluorescência FL2 (PE).

2.3 Modelo experimental *in vivo*

Neste trabalho foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, com aproximadamente 2 meses de idade, pesando entre 22 a 26 g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais foram alimentados com ração peletizada e água *ad libitum* e ciclo claro-escuro de 12 horas.

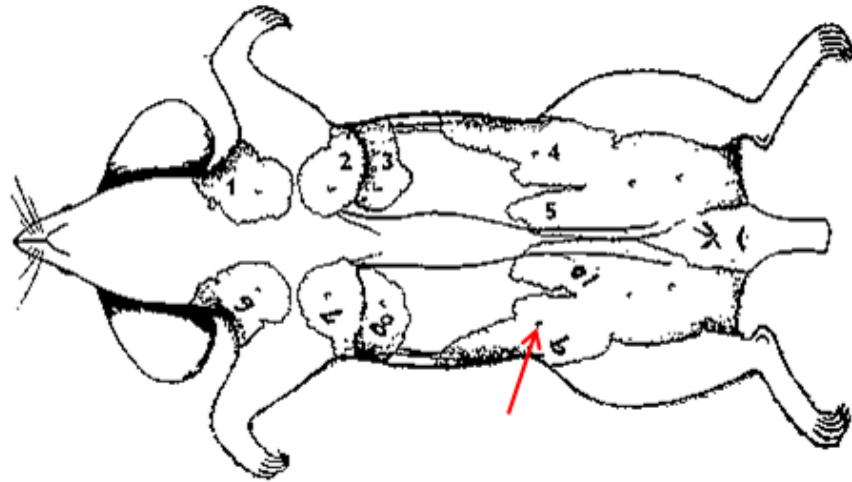
Os procedimentos experimentais utilizando animais descritos neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (Protocolo CEUAIB n° 765/10), e realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.3.1 Manutenção e implantação do tumor de Ehrlich

A manutenção *in vivo* das células tumorais do adenocarcinoma de mama de Ehrlich foi realizada através de passagens sucessivas das células tumorais, obtidas de camundongos portadores do tumor ascítico a camundongos sadios após a inoculação intraperitoneal de 10^4 células, realizado a cada 14 dias.

Como modelo experimental foi utilizado o Tumor de Ehrlich na forma ascítica (TEA) e o modelo ortotópico do tumor de Ehrlich forma sólida (TES). Foram utilizados 18 camundongos inoculados com 10^4 células tumorais pela via intraperitoneal para o desenvolvimento do TEA, e 15 camundongos inoculados com 5×10^4 células no subcutâneo da região inguinal correspondente a 9ª glândula mamária (Figura 5) para o desenvolvimento do TES. Conforme esquematizado na figura 6, as 4ª e 9ª glândulas mamárias são geralmente as melhores para estudos de tumorigênese, por causa da sua orientação ao nódulo linfático, locomoção do animal e facilidade na avaliação pelo manipulador (GALVEZ, 1999).

Figura 6 - Localização anatômica e número de glândulas mamárias em camundongos.



Vista ventral mostrando a 9ª glândula mamária (seta vermelha) onde foram inoculadas as células tumorais.

Fonte: Galvez, 1999.

2.3.2 Protocolo de tratamento dos animais portadores do tumor de Ehrlich com a jararagina

Após 24 horas da inoculação das células tumorais, grupos aleatórios de animais foram subdivididos em três subgrupos: grupo controle que receberam solução salina, grupo tratado com jararagina 400 nM e grupo tratado com jararagina 800 nM. O tratamento foi realizado diariamente, administrado pela via intraperitoneal para os grupos com TEA e pela via subcutânea próximo ao mamilo para obtenção de efeito local no grupo com TES. Abaixo a distribuição dos grupos experimentais e número de animais utilizados:

- Grupo 1: TEA solução salina (n = 6);
- Grupo 2: TEA jararagina 400 nM (n = 6);
- Grupo 3: TEA jararagina 800 nM (n = 6);
- Grupo 4: TES solução salina (n = 5);
- Grupo 5: TES jararagina 400nM (n = 5);
- Grupo 6: TES jararagina 800 nM (n = 5);
- Grupo 7: camundongos normais sem tumor (n=5).

2.3.3 Avaliação do crescimento do tumor e probabilidade de sobrevivida

Durante o período experimental foi mensurado diariamente o volume do tumor como também o peso dos animais em todos os grupos experimentais. A avaliação do crescimento tumoral nos grupos com TEA foi realizado pela diferença do volume da cavidade abdominal com tumor no 3°, 9° e 16° dia (V_f : volume final) menos o volume da cavidade abdominal antes da inoculação das células tumorais (V_o : volume inicial). As medidas do comprimento e largura foram obtidas pela documentação em sistema de imagen *in vivo* MS FX PRO (Carestream, Woodbridge, CT, USA) por 1 min, após anestesia dos animais com Xilazina/Cetamina (90 mg/K e 15 mg/K) administrada pela via intramuscular.

Nos animais portadores de TES, o crescimento do tumor foi avaliado pelas mensurações das dimensões de comprimento e largura da massa do tumor realizada semanalmente com o uso de um paquímetro digital (Mitutoyo, mensuração 0,01mm) e o cálculo do volume do tumor obtido pela fórmula:

$$\text{Volume do Tumor (cm}^3\text{)} = \frac{\text{Comprimento (cm)} \times [\text{Largura (cm)}]^2}{2}$$

A taxa de sobrevivida dos animais foi analisada por meio do teste de probabilidade de sobrevivida global de Kaplan-Meier, obtida pelo programa GraphPad Prism Versão 5.0.

2.3.4 Análise do perfil hematológico

O perfil hematológico dos animais portadores do TEA foi determinado no 7° e 14° dias após a inoculação das células tumorais, enquanto nos animais portadores do TES foi determinado no 7°, 14°, 21°, 28° e 49° dias de experimentação. As amostras de sangue periférico foram coletadas do plexo submandibular dos camundongos (Protocolos do *National Institutes of Health*, EUA ARAC, 2010) e realizadas as diluições para a contagem direta de leucócitos totais (diluição 1/20 em solução de Turk), plaquetas (diluição 1/20 em solução de oxalato de amônio) e eritrócitos (diluição 1/1000 em PBS) e contados em câmara de Neubauer. Após a contagem, foram preparados os esfregaços de sangue e corados pelo método

panótico para hematologia (metanol, eosina, hematoxilina, BIO-COR) para a determinação do número diferencial e outros aspectos citológicos.

Nos camundongos portadores do TES foi realizada a contagem de reticulócitos no sangue coletada após o 49º dia de tratamento. Brevemente, foram misturados 20 µL de sangue com 20 µL de corante azul de cresil brilhante, incubado em banho maria 37 °C por 20 minutos, e realizados os esfregaços. A leitura realizada em microscópio óptico em óleo de imersão, e os valores expressos em porcentagem média por campo, sendo contados em média 20 campos por lâmina.

2.3.5 *Análise do infiltrado inflamatório no TEA*

Foram coletados 200 µL do conteúdo peritoneal dos camundongos portadores do TEA após o 7 e 14 dias de tratamento, e lavados com PBS por centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos. O botão celular foi utilizado para a determinação das populações celulares, fases do ciclo celular e a expressão dos marcadores. Todas as amostras foram armazenadas a -20 °C na presença de crio protetores até o momento de sua análise

2.3.6 *Necropsia dos Animais (Lesões internas e Metástases)*

Nos animais portadores do TEA a necropsia foi realizada no dia da morte, coletando-se o líquido ascítico e órgãos internos e determinando-se o volume total do líquido ascítico e a relação plasma e volume celular. Foram quantificadas as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e proteínas totais presentes no sobrenadante. No grupo de animais com TES, após a eutanásia em câmara de CO₂ realizada no 49º dia de experimentação, a coleta dos tumores foi realizada. Uma fração do tumor foi fixada em glutaraldeído 5% para análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e outra fração armazenada em formol 10% para análise histológica. O restante foi digerido com solução de digestão (Colagenase tipo IV-Sigma), filtrado e armazenado com álcool 70% ou paraformaldeído 3% para a avaliação das fases do ciclo celular.

Os órgãos internos (pulmão, baço, fígado e rins) foram retirados, pesados, e avaliados as possíveis alterações macroscópicas ou lesões internas, como metástases, e finalmente foram colocados em formol 10% para posterior análise

histológica. O peso relativo foi calculado em relação a percentagem do peso do animal.

2.3.7 *Análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo*

As células do TEA coletadas no 7° e 14° dia e do TES no 49° dia fixadas em álcool 70%, foram lavadas com PBS a 1200 rpm por 5 minutos e ressuspensas em 200 µL de tampão FACSflow, sendo marcadas com iodeto de propídeo, conforme descrito na seção 2.2.6. A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de fluxo e os dados das amostras analisadas por *density plot*, os resultados expressos em percentagem média de cada população celular em relação ao volume e a intensidade de fluorescência.

A análise morfológica das células totais contidas na cavidade peritoneal dos animais com TEA foi realizada em comparação com as células peritoneais residentes da cavidade abdominal em animais normais. A coleta das células residentes da cavidade abdominal foi realizada pela lavagem com PBS estéril e armazenada nas mesmas condições que as células do TEA.

2.3.8 *Análise da expressão de marcadores por citometria de fluxo*

As amostras de células do TEA e TES armazenadas em solução paraformaldeído 2.5% foram centrifugadas, ressuspensas em tampão FACS flow e ajustadas à concentração de 10^6 células/mL. Nas amostras de ambos os grupos, os seguintes marcadores foram avaliados: superfície- CD34, CD44, VEGF-R1, IL-6r, IL-1r e citoplasmáticos- caspase-3, citocromo c, e p53. Os procedimentos para marcação com os anticorpos primários e secundários foram descritos na seção 2.2.6. A aquisição da expressão do marcador foi realizada em citômetro de fluxo em canal de fluorescência FL2 para o fluorocromo vermelho PE (Ficoeritrina) ou FL1 para o fluorocromo verde FITC (isotiocianato de fluoresceína).

Os marcadores avaliados foram classificados em: marcadores de inflamação (IL-1r, IL-6r), marcadores da regulação do ciclo celular e morte celular (p53, caspase-3 e Anexina V/PI), marcador de invasão e migração (CD44), marcadores de angiogênese (VEGF-R1 e CD34) e marcadores envolvidos na atividade mitocondrial (citocromo-c, potencial elétrico mitocondrial).

2.3.9 Marcadores de Morte Celular Anexina-V (Apoptose)/PI (Necrose) em TEA

As células do TEA fixadas em solução de paraformaldeído 2.5% foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, ressuspensas em 100 μ L de tampão de ligação como descrito anteriormente, contendo 10 μ L de iodeto de propídeo/PE (20 μ g/mL), 1 μ g de anexina-V/FITC e incubadas por 30 minutos. A leitura da quantidade da expressão de Anexina V e PI foram realizadas no citômetro de fluxo nos canais de fluorescência FL1 (Anexina V) x FL2 (PI).

2.3.10 Análise do Potencial Elétrico Mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

A análise do potencial elétrico mitocondrial nas amostras dos tumores TEA e TES foi realizada por citometria de fluxo utilizando como sonda a rodamina 123 nas amostras das células do TEA e TES. A rodamina 123 (Rh123 - Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) é um fluorocromo catiônico atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior na desta organela e sendo utilizado como um fluorocromo específico para a marcação de mitocôndrias ativas.

As amostras de células fixadas em álcool-RNase contendo RNase-A (10 mg/mL), foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em 100 μ L de tampão FACSflow contendo 5×10^4 células/mL, adicionados 5 μ L de rodamina 123 (5 mg/mL) e incubadas a 37 °C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm e o botão celular ressuspensado em 100 μ L de solução tampão FACS. A análise e aquisição das modificações do potencial elétrico mitocondrial foram realizadas em citômetro de fluxo pela aquisição de 10.000 eventos no canal de fluorescência FL1-H. Os dados foram analisados pelo programa WinMDI 2.9 e os resultados reportados como percentagem da intensidade de fluorescência.

2.3.11 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras dos tumores (TES) tratados e controle foram fixadas em glutaraldeído 5% a 4 °C. Após o tempo de fixação, as amostras foram lavadas em PBS 0,1M, água destilada, fixadas em tetróxido de ósmio (1%) e desidratadas em série crescente de álcool etílico (50°-100°). Após o período de sete dias, a secagem

dos tumores foi realizada em aparelho com ponto crítico, utilizando CO₂ e subsequente recobrimento metálico com ouro por *sputtering* (EMITECH K550), com análise e fotodocumentação em microscópio eletrônico de varredura LEO 435VP Zeiss (Carl Zeiss Alemanha) do Programa de Pós-Graduação dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária – USP.

2.3.12 *Processamento e análise histopatológica*

As amostras de tumores e órgãos internos (gânglios linfáticos inguinais, baço e fígado) coletadas dos diferentes grupos de tratamento do TES foram fixadas em formol tamponado a 10%. Os tecidos foram lavados em álcool de 70%, desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90%) em intervalos de 60 minutos cada, passados 3 vezes em álcool absoluto e 1 vez em Xilol. As amostras foram posteriormente incluídas em parafina e seccionadas em cortes de 5 µm de espessura no micrótomo (Carl Zeiss). Os cortes histológicos foram colocados em lâminas de microscopia e submetidos à coloração histológica de hematoxilina-eosina (H.E.), além de citoquímica Picrosirius-red e Tricrômico de Masson nas amostras dos tumores. A coloração para Picrosirius-red permitiu a obtenção do percentual de área de depósito de colágeno por área do tumor pelo programa de análise morfológico Imagem J versão 14.1. Foram escolhidos 10 campos aleatórios em cada grupo e para estimar a média de depósito do colágeno, representando-se a média ± desvio padrão em gráfico de barras. Qualitativamente, a deposição de colágeno foi diferenciando em três graus: grau I (fibrose focal discreta), grau II (fibrose extensiva de discreta a moderada) e grau III (fibrose multifocal de moderada a severa).

2.4 **Análise dos resultados**

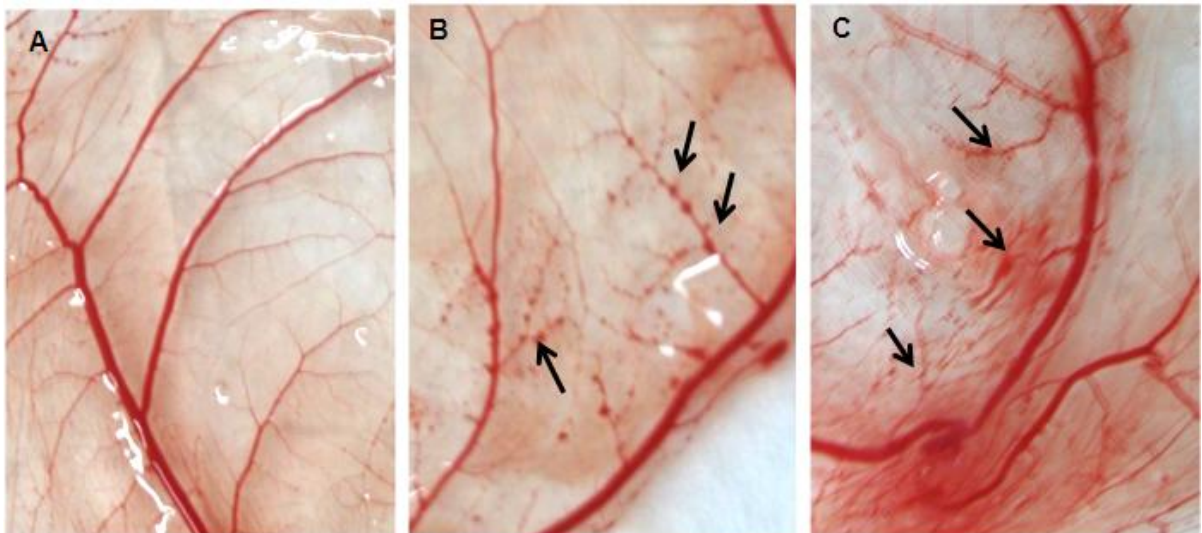
Os resultados foram expressos como média ± dp e analisados estatisticamente pelo teste de Variância simples ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. Para verificar o efeito da interação entre dois o mais fatores (tratamento x tempo x volume do tumor) utilizou-se a análise de variância de ANOVA com múltiplos fatores, seguido do teste de Bonferroni. As diferenças significantes entre o grupo controle e os grupos tratados com jararagina foram indicadas por * (p < 0,05), ** (p < 0,01) e *** (p < 0,001).

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação da atividade hemorrágica da jararagina na rede vascular da membrana corioalantóide (MCA) de embriões de galinha

A atividade hemorrágica *in vivo* da jararagina nas concentrações de 400 e 800 nM em membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha foi avaliada após 7 dias de tratamento. Após a abertura e exposição do embrião e anexos embrionários foi observado nos grupos tratados com jararagina, a formação dos novos vasos sanguíneos que apresentaram alterações marcantes em sua organização da rede vascular embrionária, com a presença de micro hemorragia periférica (seta preta) e destruição capilar nos grupos tratados com jararagina 400 nM (B) e 800 nM (C), demonstrando seu efeito e potencial hemorrágico. Entretanto, o grupo controle mostrou microvasculatura normal, sem hemorragias (Figura 7).

Figura 7 - Avaliação da atividade hemorrágica da jararagina em MCA, grupos controle (A), jararagina 400 nM (B) e 800 nM (C).



3.2 Avaliações *in vitro* dos efeitos da jararagina em células normais e tumorais de adenocarcinoma mamário

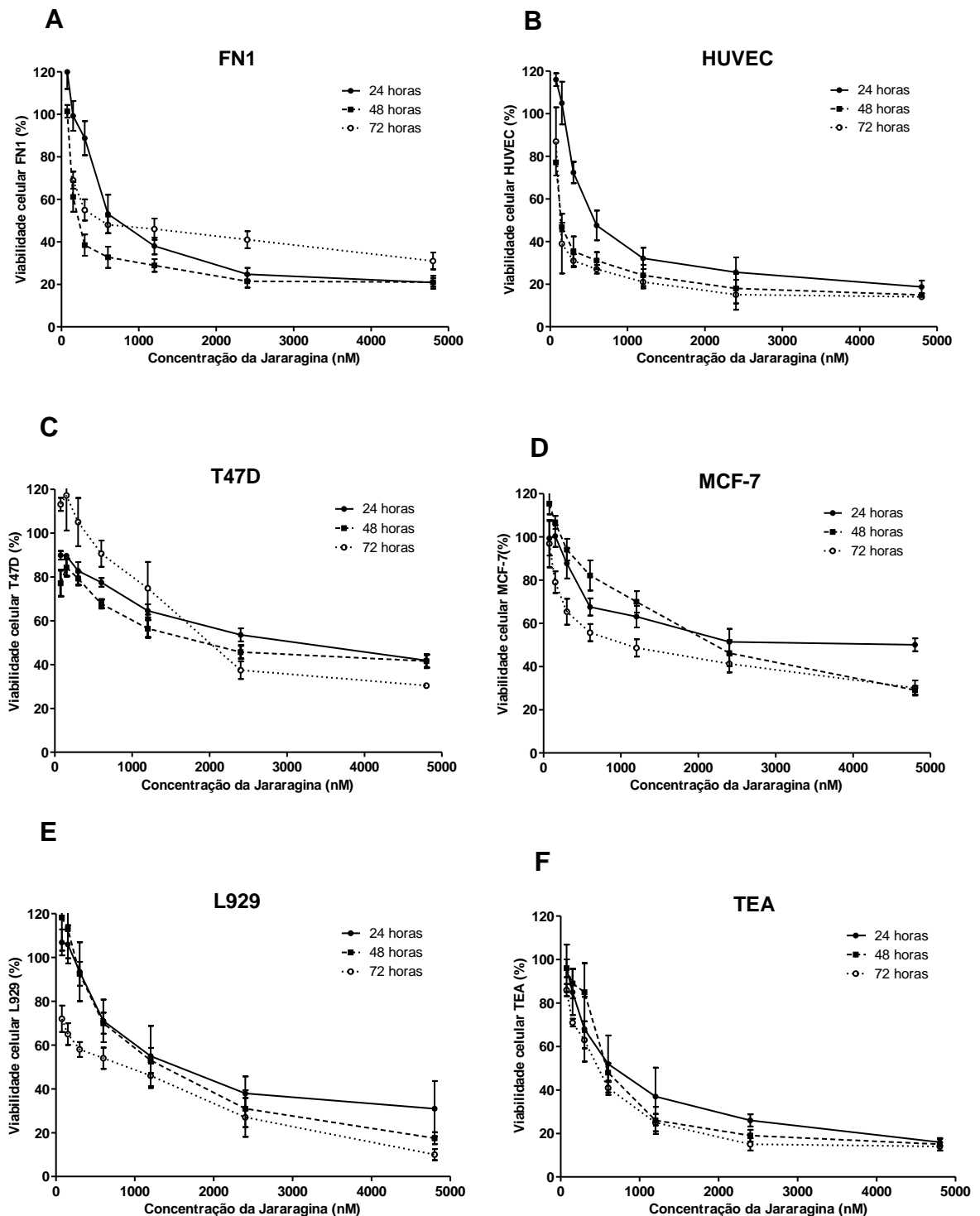
3.2.1 Avaliação da citotoxicidade celular pelo método colorimétrico MTT

As linhagens de células tumorais e normais humanas e murinas tratadas com diferentes concentrações de jararagina (75, 150, 300, 600, 1200, 2400 e 4800 nM) mostraram efeitos tempo/concentração dependentes nos diferentes tratamentos, apresentando diferenças significantes de sensibilidade entre as linhagens (Figura 8). Os valores de IC₅₀ obtidos foram 3980, 3170, 619 e 560 nM para as linhagens humanas tumorais MCF-7 e T47D, e normais FN1 e HUVEC, respectivamente, e de 598 e 1355 nM para as linhagens murinas TEA e L929, respectivamente, após 24 horas de tratamento. O tratamento por 48 e 72 horas diminuiu a viabilidade celular em todos os tipos celulares, enquanto a linhagem T47D mostrou uma recuperação na adesão ao substrato e viabilidade nos tratamentos menores ao IC₅₀ (Tabela 1). As linhagens tumorais humanas MCF-7 e T47D apresentaram viabilidade celular significativamente maior (**p < 0,01) quando comparadas às células humanas normais (HUVEC e FN1), após o tratamento com as concentrações de 2400 e 4800 nM de jararagina. Nas células murinas observou-se o efeito inverso. Os fibroblastos L929 apresentaram maior viabilidade que o tratamento das células do TEA em concentrações de 1200, 2400 e 4800 nM de jararagina. A concentração de 75 nM de jararagina não mostrou diferenças significativas na diminuição da viabilidade em todos os tipos celulares estudados.

Tabela 1 - Valores do IC₅₀ das linhagens celulares tumorais e normais humanas e murinas após tratamento com jararagina.

Linhagem		IC ₅₀ [nM / µg]		
		24 h	48 h	72 h
Normais	FN1	619 (3,1)	317 (1,59)	460 (2,3)
	HUVEC	560 (2,8)	142 (0,71)	120 (0,6)
Tumorais	T47D	3170 (15,9)	1940 (9,7)	1960 (9,8)
	MCF-7	3980 (20)	2190 (11)	1130 (5,65)
	L929	1355 (11,8)	1160 (5,9)	884 (4,42)
	TEA	598 (3,0)	570 (2,85)	490 (2,45)

Figura 8 - Viabilidade celular após tratamento com jararagina avaliado pelo teste colorimétrico MTT



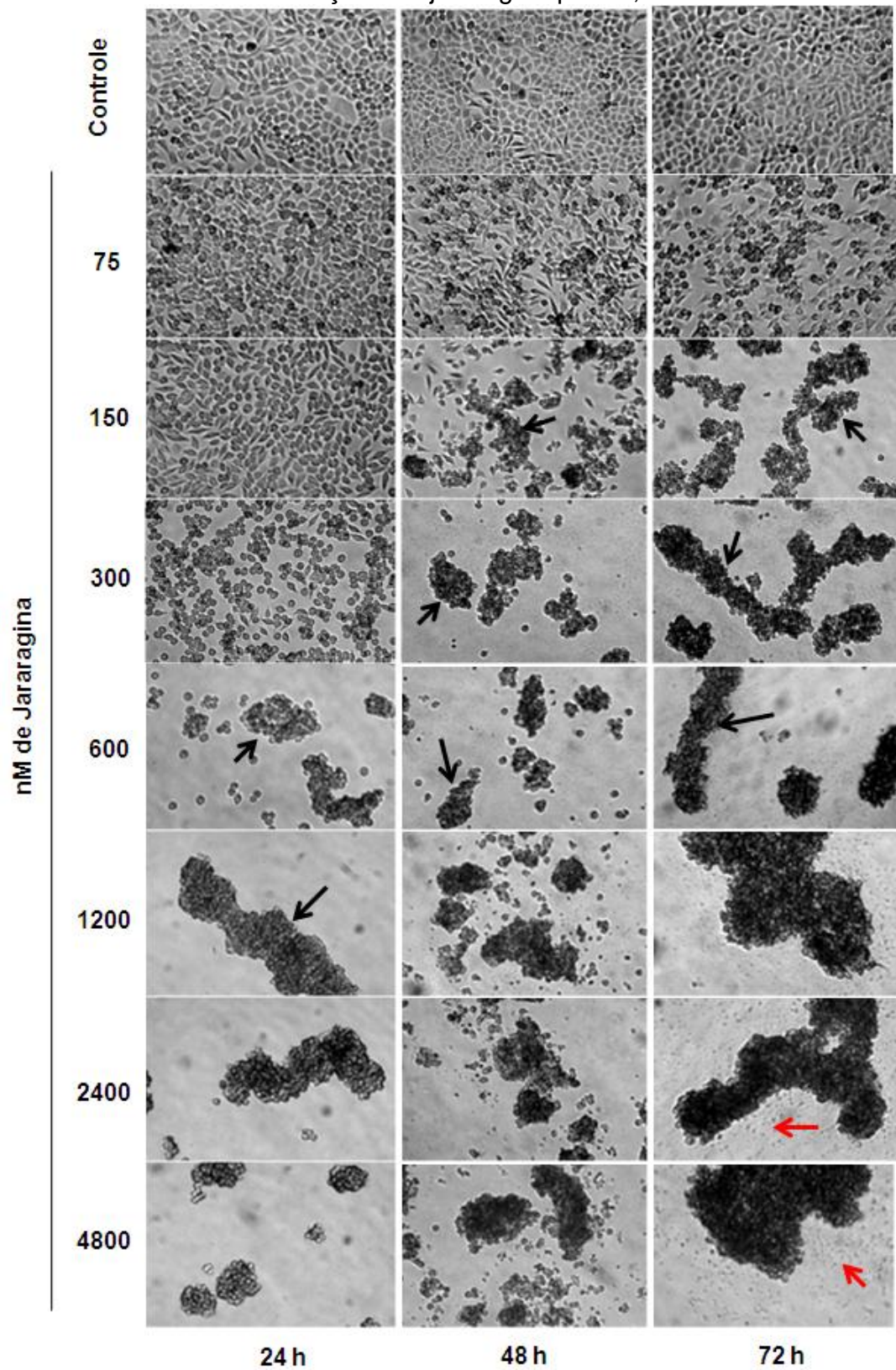
Curva de dose/tempo resposta de fibroblasto humano normal FN1 (A), células endoteliais humanas HUVEC (B), células tumorais de mama T47D (C) e MCF-7 (D), células de fibroblasto murino normal L929 (E) e células do TEA (F). As células foram tratadas com jararagina por 24, 48 e 72 horas. Os resultados expressos em porcentagem de viabilidade comparados ao controle são representados como média \pm dp de três experimentos independentes.

3.2.2 Avaliação das alterações morfológicas

Entre os efeitos de toxicidade da jararagina que influenciaram na viabilidade celular estão as alterações na morfologia das linhagens aderentes (MCF-7, T47D, HUVEC, FN1 e L929) após a exposição nas concentrações de 300, 600, 1200, 2400, 4800 nM. Em todas estas linhagens observa-se a retração dos prolongamentos citoplasmáticos e formação de agregados multicelulares, que aumentaram de tamanho quando expostos às maiores concentrações. Na concentração de 4800 nM, algumas linhagens com maior sensibilidade apresentaram a formação de debris celulares como as linhagens HUVEC e L929 que predominaram após 48 e 72 horas de tratamento.

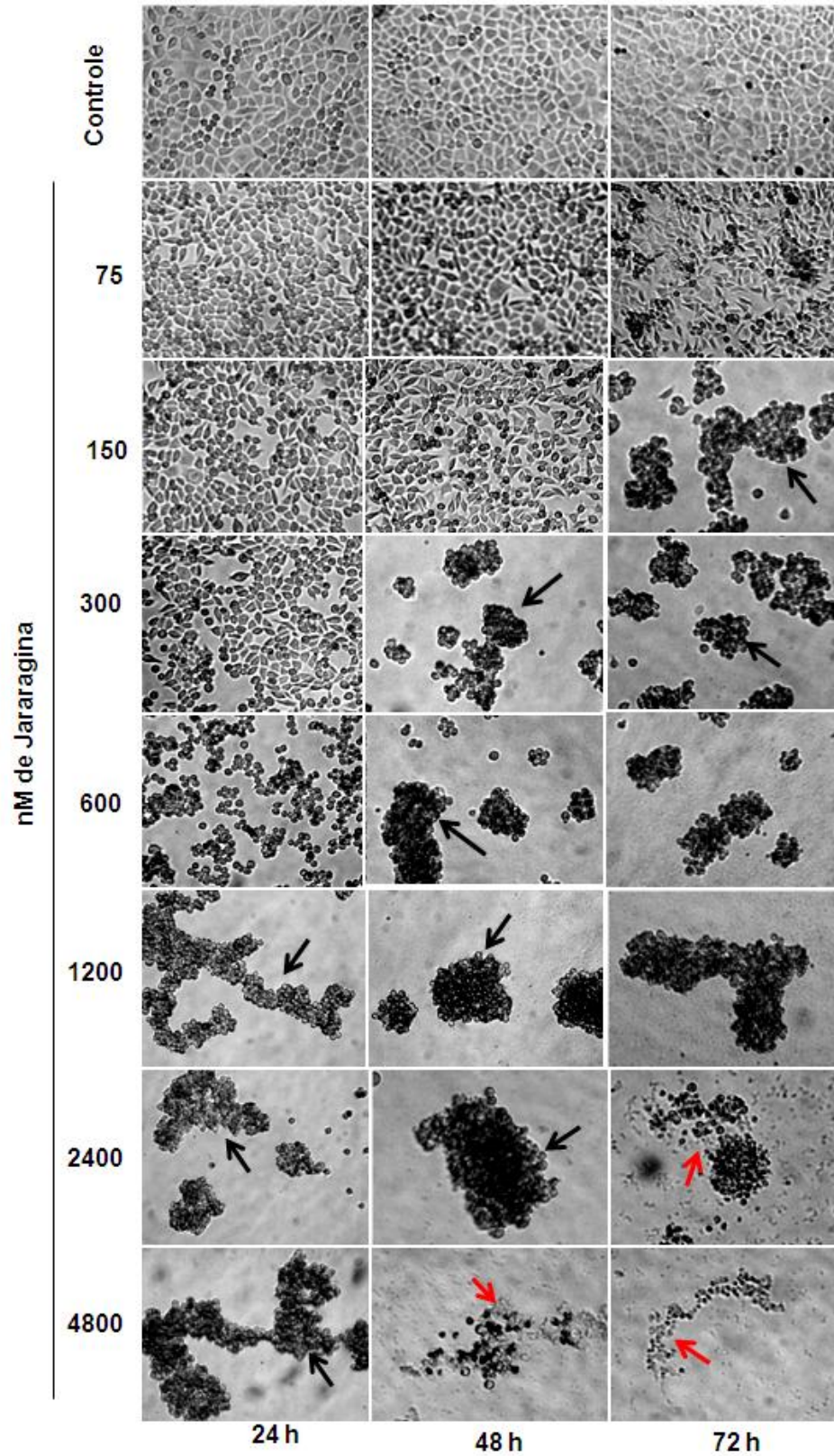
As células do TEA não formaram agregados, devido às características do tipo celular que crescem em suspensão no fluido ascítico. Os aspectos morfológicos das culturas celulares após tratamento com diferentes doses de jararagina durante 24, 48, e 72 h são ilustrados nas figuras 9 (FN1), 10 (HUVEC), 11 (T47D), 12 (MCF7), 13 (L929) e 14 (TEA). As imagens foram capturadas em microscópio de luz invertido com aumento de 200X.

Figura 9 - Aspecto morfológico da cultura de fibroblasto humano FN1 tratada com diferentes concentrações de jararagina por 24, 48 e 72 horas.



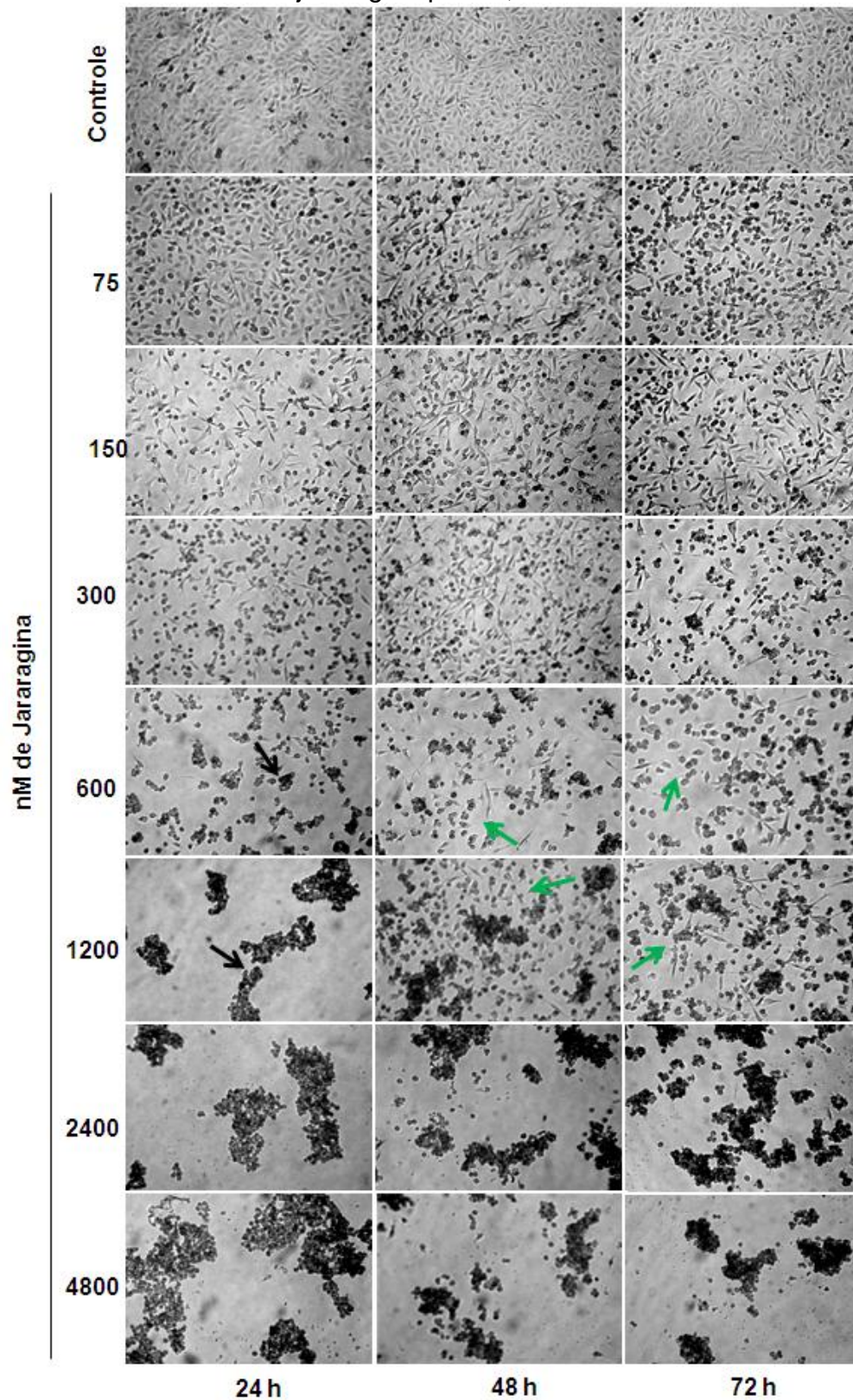
Observar a perda dos prolongamentos citoplasmáticos fusiformes, formação de agregados multicelulares (seta preta) e debris (seta vermelha), tempo/concentração dependentes, Aumento 200X.

Figura 10 - Aspecto morfológico da cultura da célula endotelial humana HUVEC tratada com diferentes concentrações de jararagina por 24, 48 e 72 h.



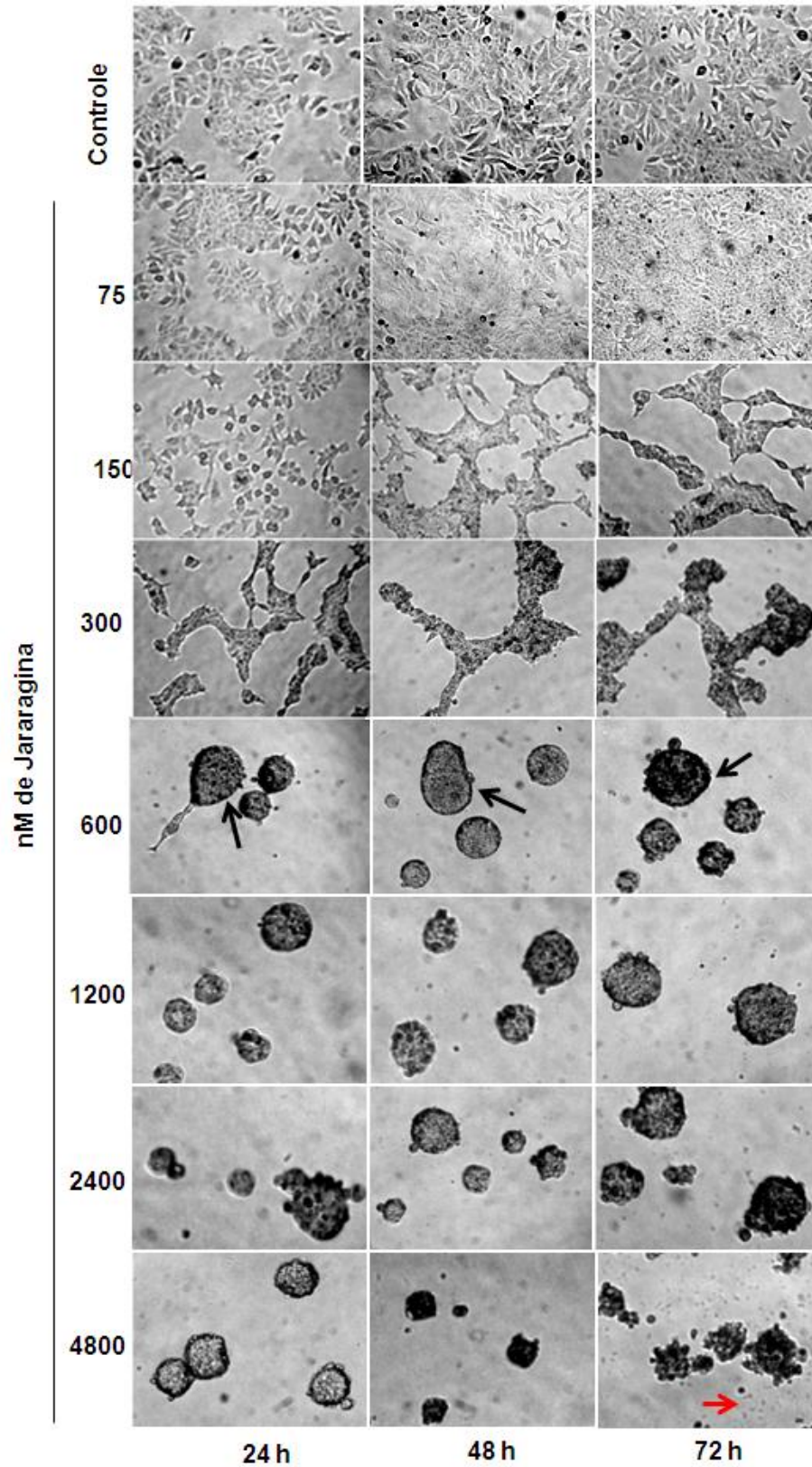
Foram observadas perdas dos prolongamentos fusiformes, e formação de agregados multicelulares (seta preta) e debris (seta vermelha) tempo/concentração dependente, aumento 200X.

Figura11 - Aspecto morfológico da cultura de células de tumor de mama humano T47D tratadas com jararagina por 24, 48 e 72 horas.



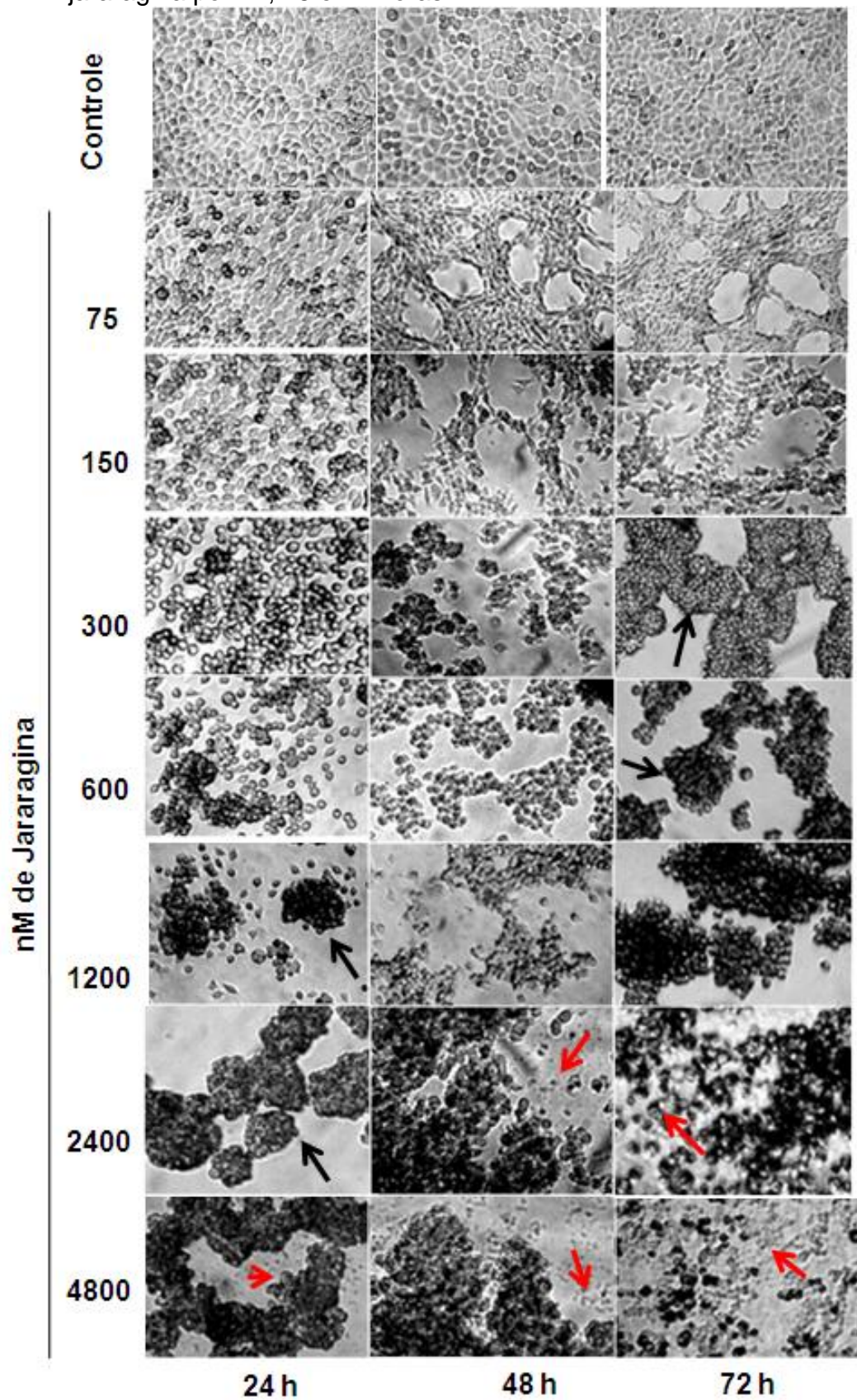
Observa-se formação de agregados celulares (seta verde), e as concentrações de 600 e 1200 nM após 48 h de exposição observa-se a adesão e espriamento de células com aspecto fibroblastoide, aumento 200X.

Figura 12 - Aspecto morfológico da cultura de células de tumor de mama humano MCF7 tratadas com jararagina por 24, 48 e 72 horas.



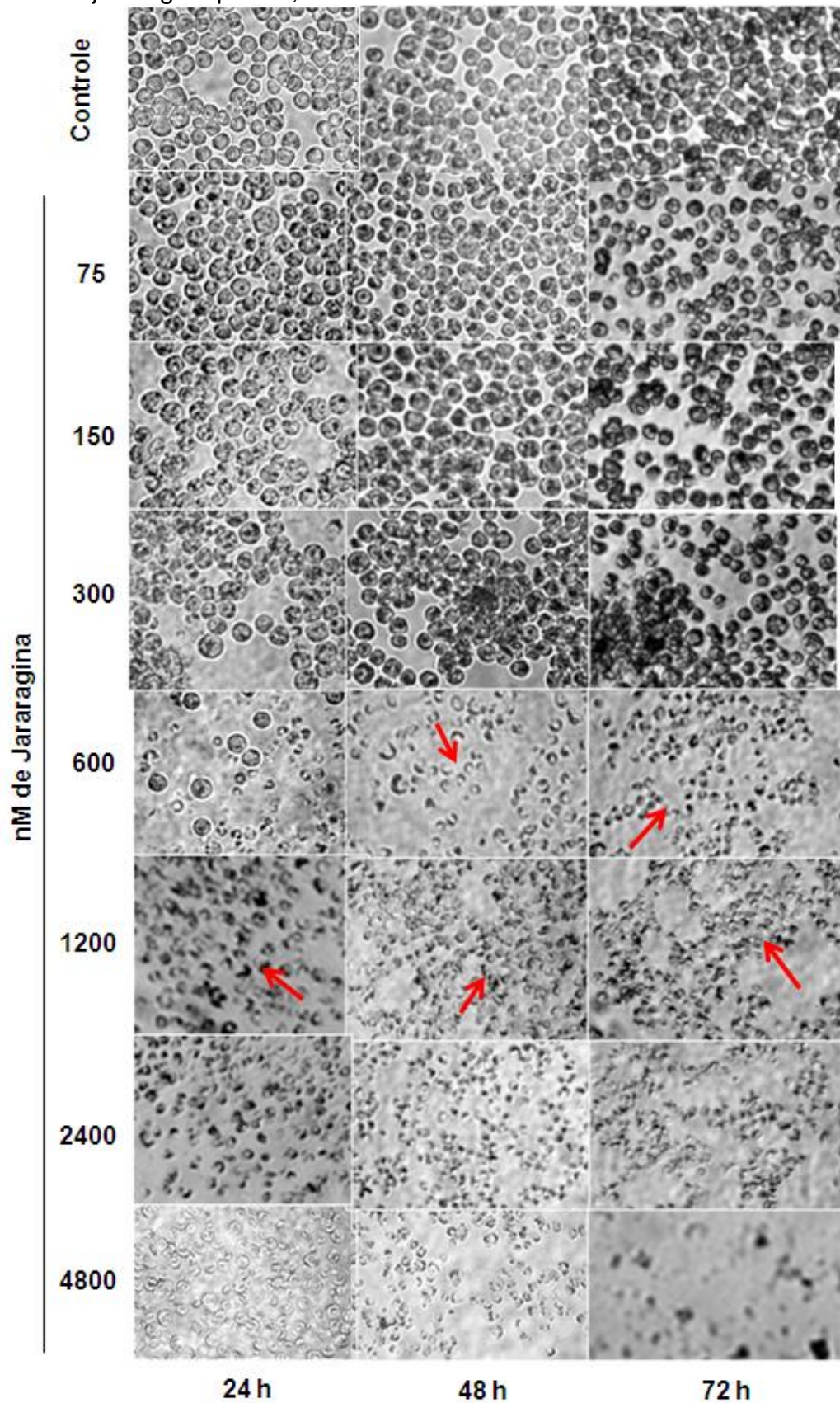
Observa-se a formação de estruturas multicelulares dimensionais (seta preta) tipo esferoides a partir da concentração de 600 nM, e a presença de debris celulares (seta vermelha), aumento 100X.

Figura 13 - Aspecto morfológico da cultura de fibroblasto murino L929 tratadas com jararagina por 24, 48 e 72 horas.



Observa-se perdas dos prolongamentos fusiformes, formação de agregados multicelulares (seta preta) e debris (seta vermelha) tempo/concentração dependentes, aumento 200X.

Figura 14 - Aspecto morfológico da cultura de células do TEA tratadas com jararagina por 24, 48 e 72 horas.



Observa-se debris celulares (seta vermelha) a partir da concentração de 600 nM de jararagina. Aumento 200X.

3.2.3 Avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de tripan

O tratamento das linhagens celulares com jararagina resultou em um drástico descolamento celular que foi acompanhado da formação de agregados no sobrenadante. A avaliação da viabilidade das células contidas no sobrenadante pelo método de exclusão do azul de tripan foi realizada após a perda de aderência celular dose/tempo-dependente.

Em linhagens humanas, após 24 horas, a viabilidade celular foi maior que 90% quando tratadas até a concentração de 2400 nM, com exceção da célula endotelial HUVEC que foi a mais sensível. A concentração de 4800 nM diminuiu significativamente a viabilidade em quase todas as linhagens celulares, com exceção da T47D que foi a mais resistente ao tratamento. Esses dados corroboram com as concentrações inibitórias IC_{50} obtidas nos experimentos de MTT. Após 48 e 72 horas, a viabilidade celular diminuiu significativamente nas células normais, enquanto as células tumorais apresentam viabilidade celular em média de 50% (Tabela 2).

As linhagens celulares murinas mostraram-se mais sensíveis ao tratamento com jararagina. Entre elas, os fibroblastos normais L929 apresentaram viabilidade significativamente maior que as células de TEA, mostrando também um efeito tempo/concentração dependentes. Os dados estão apresentados na Tabela 2.

As imagens dos aspectos citológicos da viabilidade celular corada (inviáveis) e não coradas (viáveis) pelo teste de exclusão do azul de tripan obtidos na câmara de Neubauer estão ilustrados nas figuras 15 a 19.

Na figura 15, fibroblastos humanos FN1 (A) e células endoteliais HUVEC (B), no grupo tratado com jararagina, há indução de morte celular com formação de vacúolos refringentes e densos no citoplasma nas concentrações de 1200 a 4800 nM. Entretanto, nas concentrações de 2400 e 4800 nM após 48 e 72 horas as células HUVEC tornam-se picnóticas com degeneração celular acentuada e significativa diminuição na viabilidade celular.

Tabela 2 - Viabilidade celular das linhagens celulares pelo método de exclusão do azul de tripan, após 24, 48 e 72 horas de tratamento com jararagina

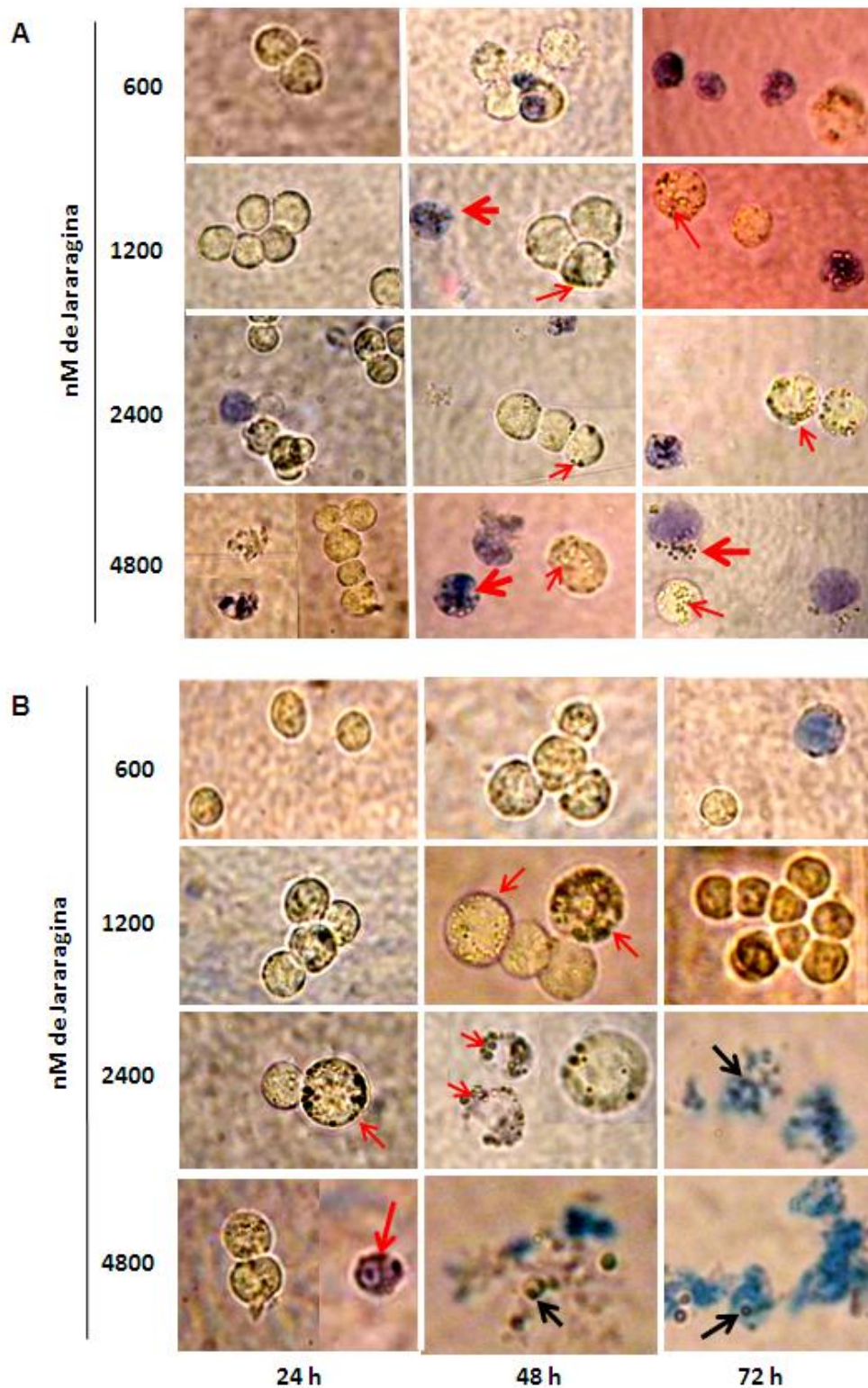
	Linhagem celular	Tempo (horas)	Viabilidade celular (%)/concentração da jararagina (nM)				
			600	1200	2400	4800	
H U M A N O	Normal	24	95 ± 2,3	93 ± 3,2	90 ± 3,2	78 ± 4,0	
		48	76 ± 8,3	78 ± 9,2	64 ± 8,6	15 ± 3,2	
		72	52 ± 6,3	32 ± 5,4	28 ± 4,5	12 ± 2,6	
	HUVEC	24	95 ± 3,2	92 ± 4,2	74 ± 5,6	50 ± 4,5	
		48	54 ± 7,9	36 ± 4,3	28 ± 4,2	0	
		72	18 ± 5,2	17 ± 2,4	16 ± 3,4	0	
	Tumoral	T47D	24	97 ± 1,5	97 ± 2,1	96 ± 3,2	95 ± 3,6
			48	95 ± 2,4	87 ± 2,3	84 ± 5,6	78 ± 4,1
			72	83 ± 3,2	76 ± 3,1	71 ± 4,0	68 ± 5,4
		MCF-7 *	24	92 ± 5,6	91 ± 9,5	90 ± 7,3	85 ± 7,9
			48	80 ± 7,2	74 ± 7,2	68 ± 5,4	54 ± 6,3
			72	82 ± 7,8	63 ± 6,8	55 ± 6,3	45 ± 5,7
M U R I N O	Normal	L929	24	94 ± 3,7	93 ± 3,1	92 ± 4,6	87 ± 5,4
		48	90 ± 2,8	70 ± 4,6	20 ± 6,2	0	
		72	21 ± 5,8	0	0	0	
	Tumoral	TEA	24	92 ± 5,3	90 ± 4,8	70,9 ± 6,1	28 ± 4,2
			48	82 ± 4,6	18 ± 4,6	0	0
			72	79 ± 3,8	0	0	0

Valor expresso em porcentagem média ± dp

(*) Contagem estimado na proporção da área com células viáveis nos esferóides

(0) Células mortas ou presença de debris celulares

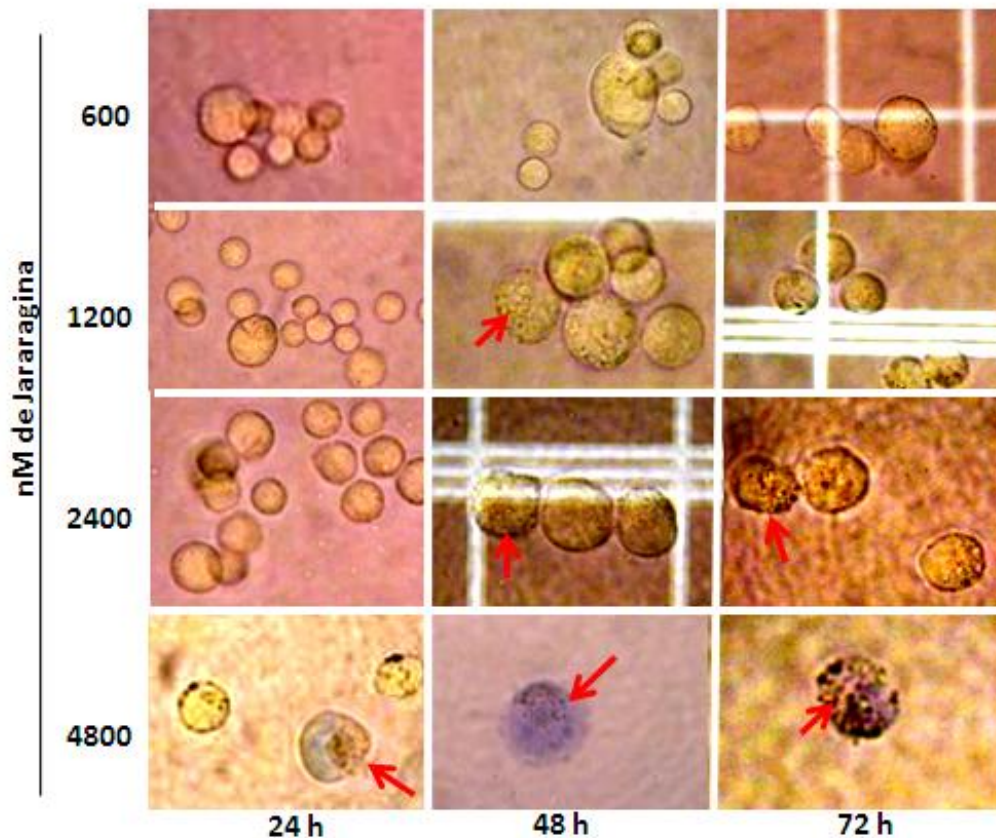
Figura 15 - Aspecto citológico dos fibroblastos humanos FN1 (A) e HUVEC (B) após tratamento com jararagina, avaliadas pelo método de exclusão do azul de tripan, células inviáveis cor azul.



Fibroblasto humanos FN1 (A) e HUVEC (B) mostraram a presença de vacúolos (seta vermelha), e células picnóticas (seta preta) com a formação de debris e micronúcleos (azuis) nas concentrações de 1200 a 4800 nM. Aumento 400X.

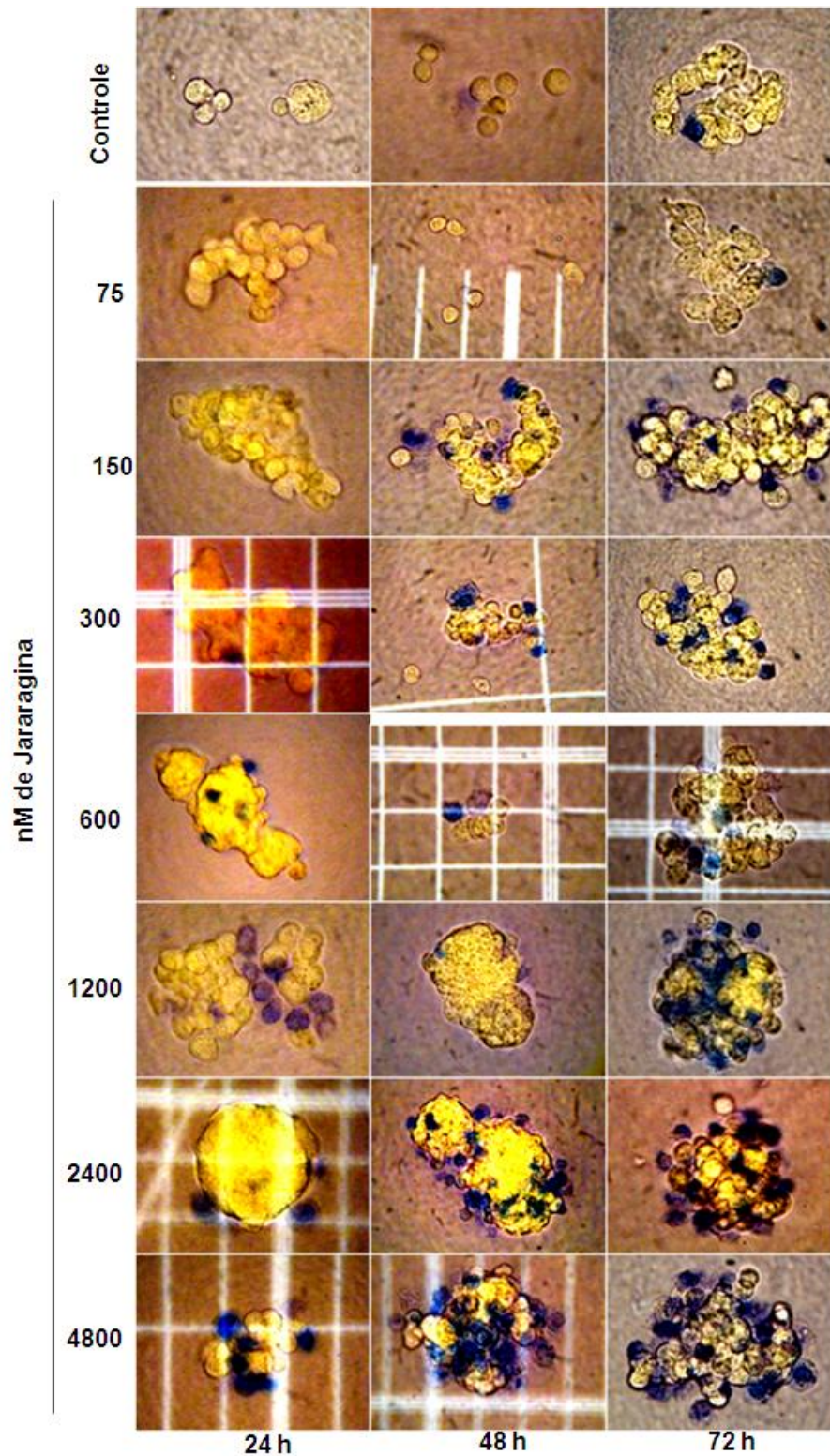
Nas células tumorais humanas, foram observadas diferenças na densidade celular e compactação dos agregados. As células tumorais T47D foram desagregadas e ao microscópio apresentaram-se individualizadas e viáveis (Figura 16), enquanto as células tumorais MCF-7 formaram agregados celulares compactos tipo esferoides, rodeados de células com perda da viabilidade celular (Figura 17). Após a homogeneização mecânica, estes agregados multicelulares do tipo esferoides foram observados em todos os tempos de tratamento. A maior compactação foi obtida nas concentrações de 1200 e 2400 nM com diminuição da viabilidade tempo/dose dependentes. Na concentração de 4800 nM observa-se a formação de agregados menores com maior porcentagem de células mortas.

Figura 16 - Aspecto citológico das células do tumor de mama humano T47D, após tratamento com jararagina por 24, 48 e 72 horas, avaliada pelo método do azul de tripan.



As células de tumor de mama T47D mostraram a presença de vacúolos refringentes e densos (seta vermelha) com alta porcentagem de células viáveis nas concentrações de 600 a 2400 nM. Captura da imagem em microscópio óptico. Aumento 400X.

Figura 17 - Aspecto citológico das células do tumor de mama humano MCF7, após tratamento com jararagina por 24, 48 e 72 h. avaliada pelo método de exclusão do azul de tripan.



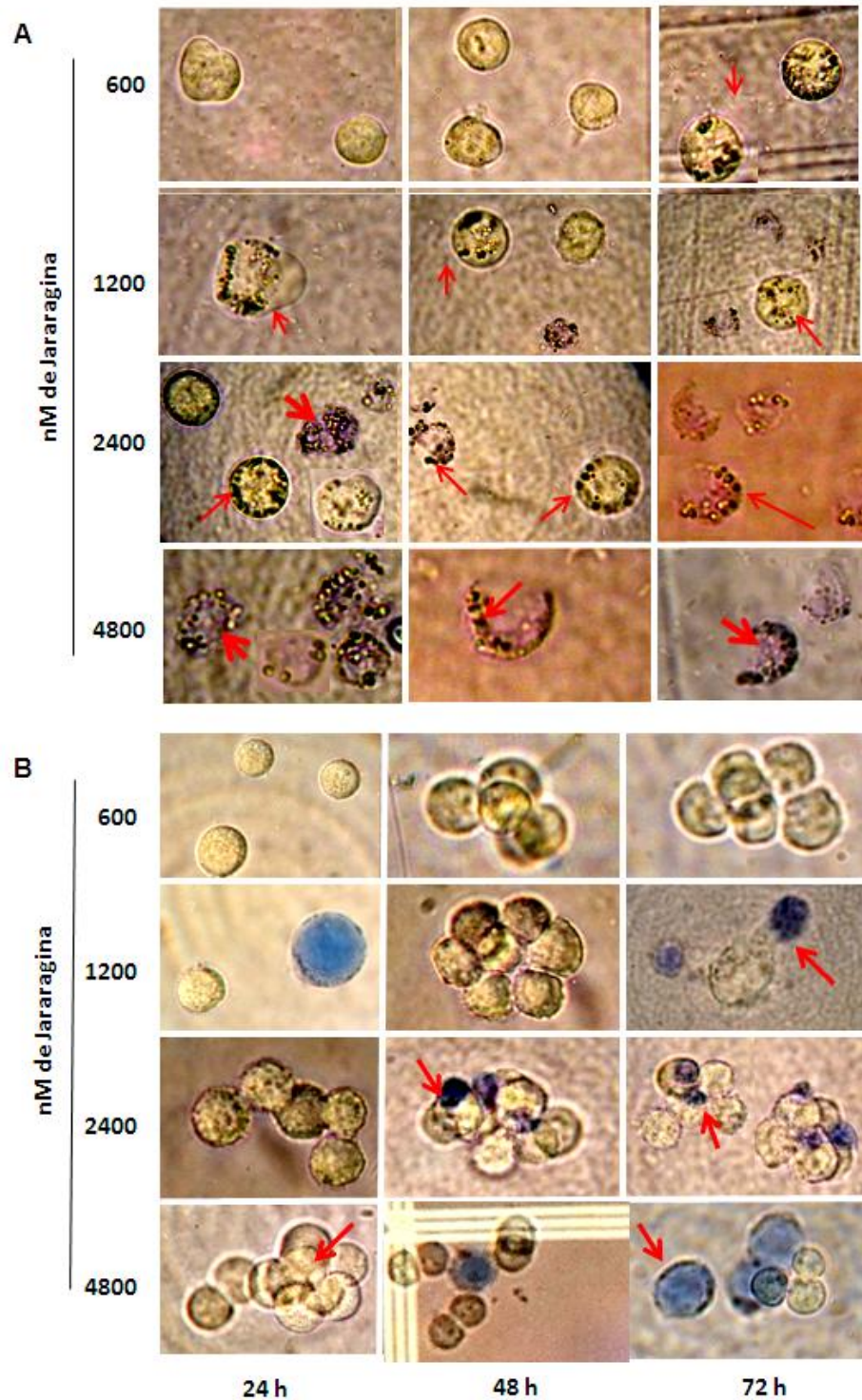
As células de tumor de mama MCF-7 mostraram a formação de agregados multicelulares do tipo esferóides, com células viáveis e mortas (azuis) ao redor dos agregados de forma tempo/dose dependentes. Aumento 100X.

As alterações citológicas observadas nas células murinas do TEA e fibroblastos L929 após o tratamento com a jararagina estão mostradas na figura 18.

Nas células do TEA, além do aspecto morfológico de lise celular mostrado a partir de concentrações maiores a 600 nM (Figura 14), foram observadas células viáveis nos três tempos de tratamento quando avaliadas por azul de tripan. As concentrações maiores a 600 nM mostraram efeitos citotóxicos, com aumento porcentual da mortalidade celular, formação de vacúolos, fusão lisosomal e marginilização, acompanhada de fragmentação da membrana citoplasmática. Os núcleos celulares apresentavam-se proeminentes e deslocados para a periferia (Figura 17A).

Em fibroblastos murinos L929 observa-se a formação de poucos agregados celulares regulares e células inviáveis com vacúolos e integridade da membrana citoplasmática em altas concentrações de jararagina (Figura 17B).

Figura 18 - Aspecto citológico das células do TEA e fibroblasto L929, após tratamento com jararagina, avaliadas pelo método de exclusão do azul de tripan.



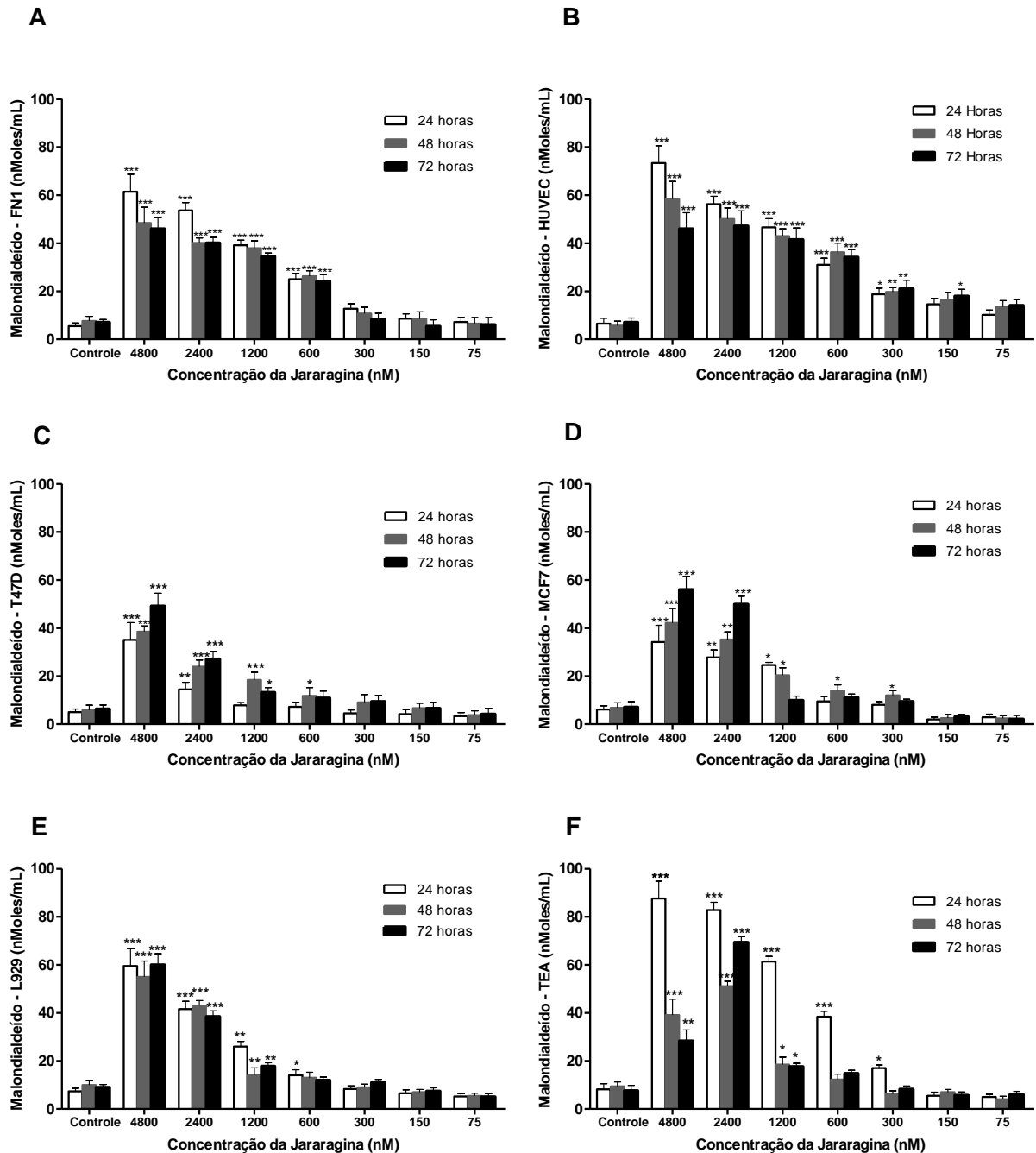
A) Células de carcinoma de mama murino de Ehrlich (TEA) com formação de vacúolos intracelulares densos, fusão lisossomal e marginilização em células vivas (seta vermelha fina), e células mortas com núcleo deslocado periférico (azuis). B) Fibroblastos L929 agregados com alguns vacúolos e células mortas sem perda da morfologia celular (azuis). Aumento 100X.

3.2.4 *Determinação de produtos da lipoperoxidação (LPO) por quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs)*

A peroxidação lipídica nas membranas celulares e a formação de radicais livres foram quantificadas pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). O malondialdeído (MDA) é um dos produtos finais da lipoperoxidação formado pela decomposição primária ou secundária de produtos intermediários, e reage com o ácido tiobarbitúrico, sendo amplamente utilizado na determinação do estresse oxidativo.

O tratamento com altas concentrações de jararagina resultou em uma significativa formação de radicais peroxidados lipídicos das linhagens normais e tumorais de mama, com danos oxidativos significativos nas concentrações de 4800, 2400, e 1200 nM em todas as linhagens (Figura 19). As células endoteliais HUVEC, fibroblastos humanos FN1 e murinos L929, e células do TEA apresentaram maior produção de radicais peroxidados, após 24, 48 e 72 horas de tratamento com jararagina. A quantificação de TBARs nas linhagens tumorais de mama humana T47D e MCF-7 revelou menor produção de radicais livres nas altas concentrações, a qual foi aumentando progressivamente com o maior tempo de incubação com a jararagina. O aumento da produção de radicais livres pode estar relacionado com o maior número de células T47D viáveis nos tempos de 48 e 72 horas, enquanto nas células MCF7 pode estar relacionado às alterações morfológicas (esferoides), com maior produção de radicais livres após 72 horas nas concentrações de 4800 e 2400 nM.

Figura 19 - Quantificação de radicais livres poliinsaturados peroxidados (Malondialdeído – MDA) formados no sobrenadante das culturas das linhagens normais e tumorais tratadas com jararagina. Linhagens celulares: FN1 (A), HUVEC (B), T47D (C), MCF-7 (D), TEA (E) e L929 (F).



Dados expressos em média \pm dp analisados pelo teste de Variância ANOVA seguida pelo teste múltiplo de Tukey-Kramer, significância estatística $p < 0,05$.

3.2.5 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

Após a avaliação da viabilidade celular pelos métodos MTT e de exclusão de azul de tripan, o efeito da jararagina nas fases do ciclo celular foi determinado. As concentrações de 600 e 2400 nM foram selecionadas por serem próximas aos valores do IC₅₀ para as linhagens sensíveis e resistentes, respectivamente, após 24 horas de tratamento. Foram coletados os agregados celulares tanto do sobrenadante como das células aderentes após tripsinização e avaliados por citometria de fluxo. Os histogramas mostram a porcentagem de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular G₀/G₁, S e G₂/M, e células sub-G₁.

Observa-se que a jararagina altera a proporção das células nas diferentes fases do ciclo celular, com variações no efeito citotóxico entre as linhagens celulares tumorais e normais. O valor da porcentagem média \pm dp das células nas fases do ciclo celular e os histogramas representativos estão apresentados nas figuras a seguir e as informações das alterações estão apresentadas na Tabela 3.

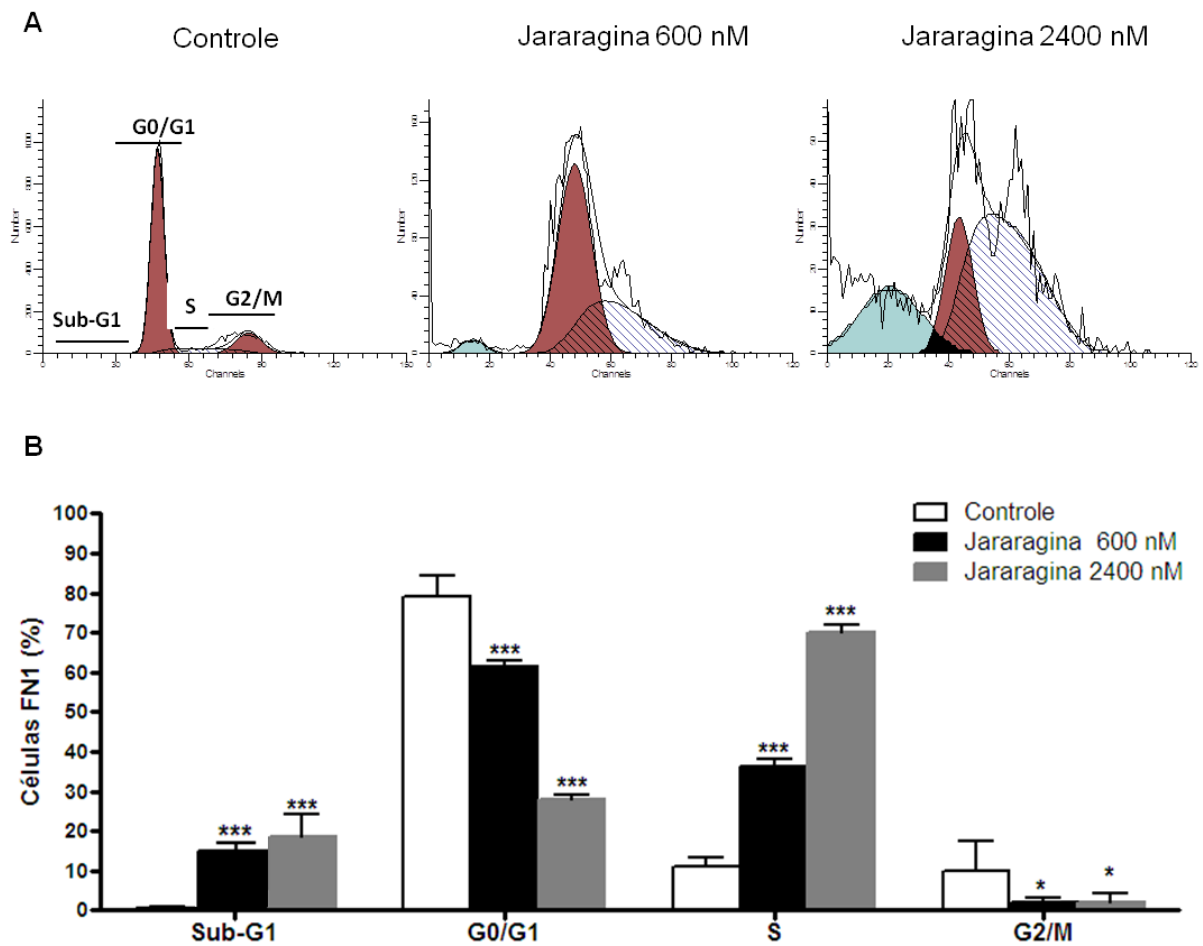
Tabela 3 - Efeito da jararagina no ciclo celular após 24 horas de tratamento.

Linhagem celular	Jararagina (nM)	
	600 nM	2400 nM
FN1	↓G ₀ /G ₁ , ↑S	↓G ₀ /G ₁ , ↑S
HUVEC	↓G ₀ /G ₁ , ↑G ₂ /M	↑S
T47D	↓G ₀ /G ₁ , ↑S	↑S, ↓G ₀ /G ₁
MCF-7	↑G ₀ /G ₁ , ↓S	↓G ₂ /M
L929	↓G ₀ /G ₁	↑S
TEA	↑S	↑S

Aumento (↑) ou diminuição (↓) das fases do ciclo celular: G₀/G₁, S e G₂/M.

Em fibroblastos humanos normais FN1, o tratamento com jararagina nas concentrações de 600 e 2400 nM aumentou significativamente a proporção de células na fase S (** $p < 0,001$), diminuindo as fases G0/G1 e G2/M. Além disso, o tratamento com na concentração de 2400 nM aumentou significativamente a porcentagem de células em sub-G1 (18,4%) em comparação ao controle (Figura 20).

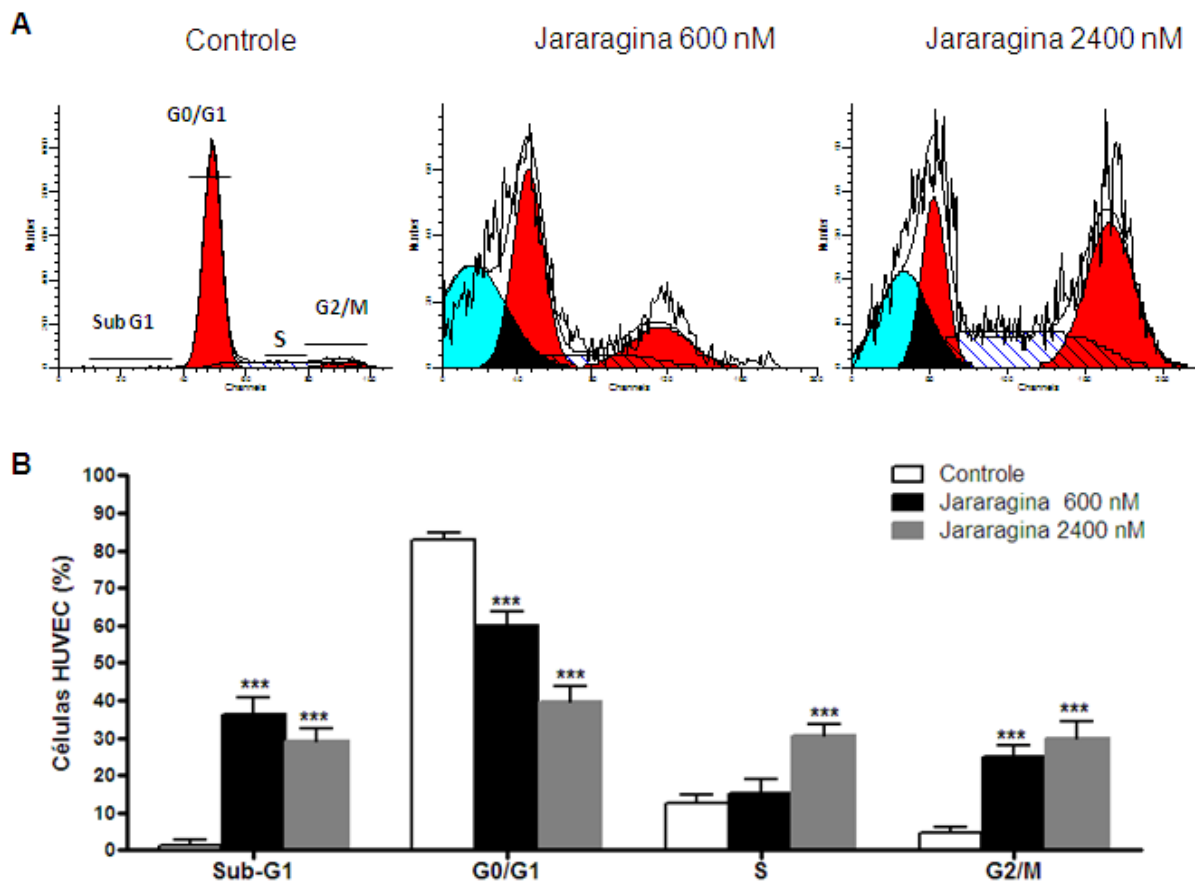
Figura 20 - Avaliação do ciclo celular em células de fibroblasto humano FN1 após 24 horas de tratamento com jararagina e grupo controle.



(A) Histogramas representativos da quantificação de DNA obtidos por citometria de fluxo para o grupo controle e tratado com jararagina nas concentrações de 600 nM, 2400 nM, mostram aumento da fase S nas células tratadas com a jararagina, (B) Gráfico de barras representativo da distribuição das fases do ciclo celular expressos em porcentagem medias \pm dp (n=3), e analisados por citometria de fluxo. Teste de Variância de ANOVA seguido do teste de Tukey Kramer, *($p < 0,5$), ***($p < 0,001$).

As células endoteliais humanas HUVEC tratadas com 600 e 2400 nM de jararagina apresentaram aumento significativo na porcentagem de células em sub-G1 em torno de 35% ($p < 0,001$), mostrando a susceptibilidade desta célula em ambas as concentrações, com consequente significativa diminuição das fases G0/G1 ($p < 0,01$) e aumento de de G2/M (Figura 21).

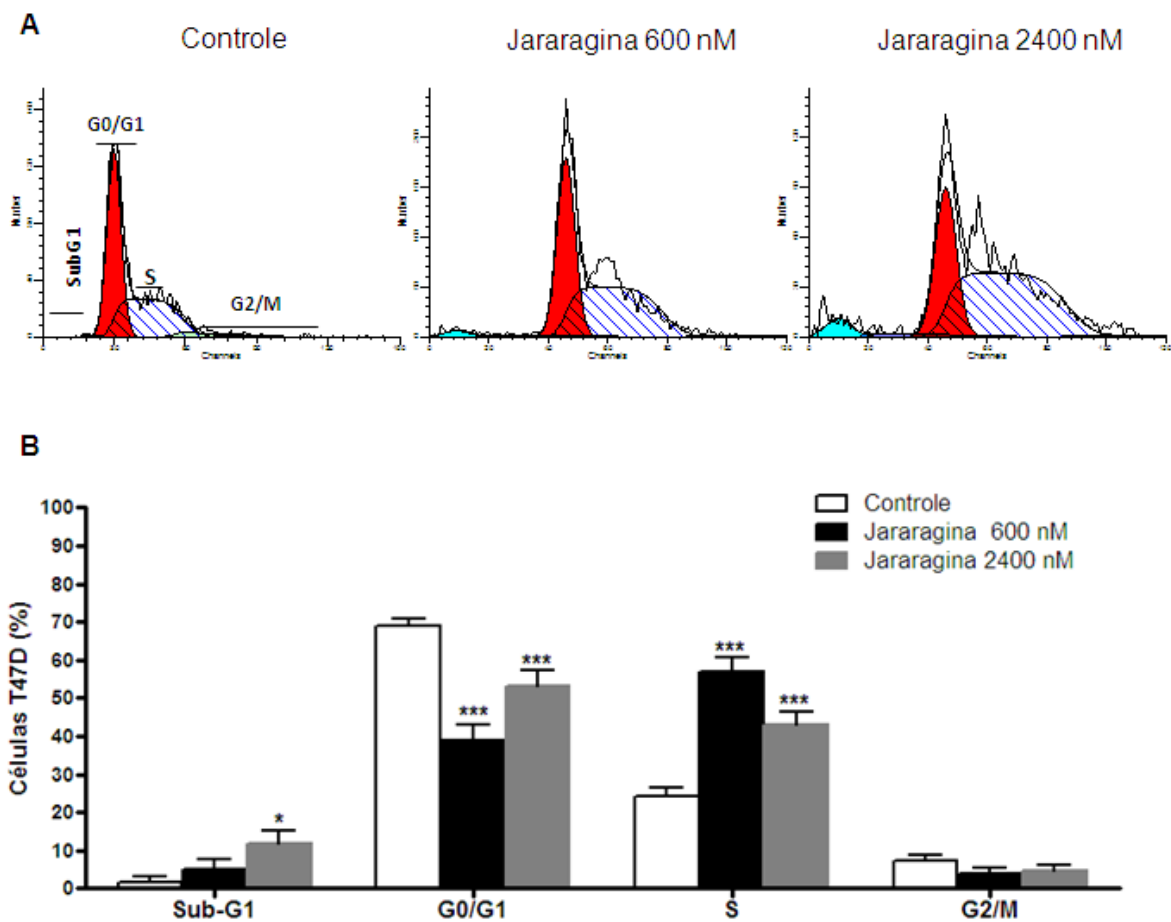
Figura 21 - Avaliação do ciclo celular em células endoteliais humanas HUVEC após 24 horas de tratamento com jararagina e grupo controle.



(A) Histogramas representativos da quantificação de DNA obtidos por citometria de fluxo para o grupo controle e tratado com jararagina nas concentrações de 600, 2400 nM, mostrando aumento das células em sub-G1 após tratamento com a jararagina, (B) Gráfico representativo da distribuição das fases do ciclo celular expressos em porcentagem médias \pm dp ($n=3$), e analisados por citometria de fluxo. Teste de Variância de ANOVA seguido do teste de Tukey Kramer, ***($p < 0,001$).

Em células tumorais T47D, o tratamento com a jararagina nas concentrações de 600 e 2400 nM induziu aumento significativo ($p < 0,001$) na proporção de células na fase S, e diminuição significativa da fase G0/G1 ($p < 0,001$). A porcentagem de células em sub-G1 também aumentou significativamente a 11% na concentração de 2400 nM ($p < 0,05$), (Figura 22).

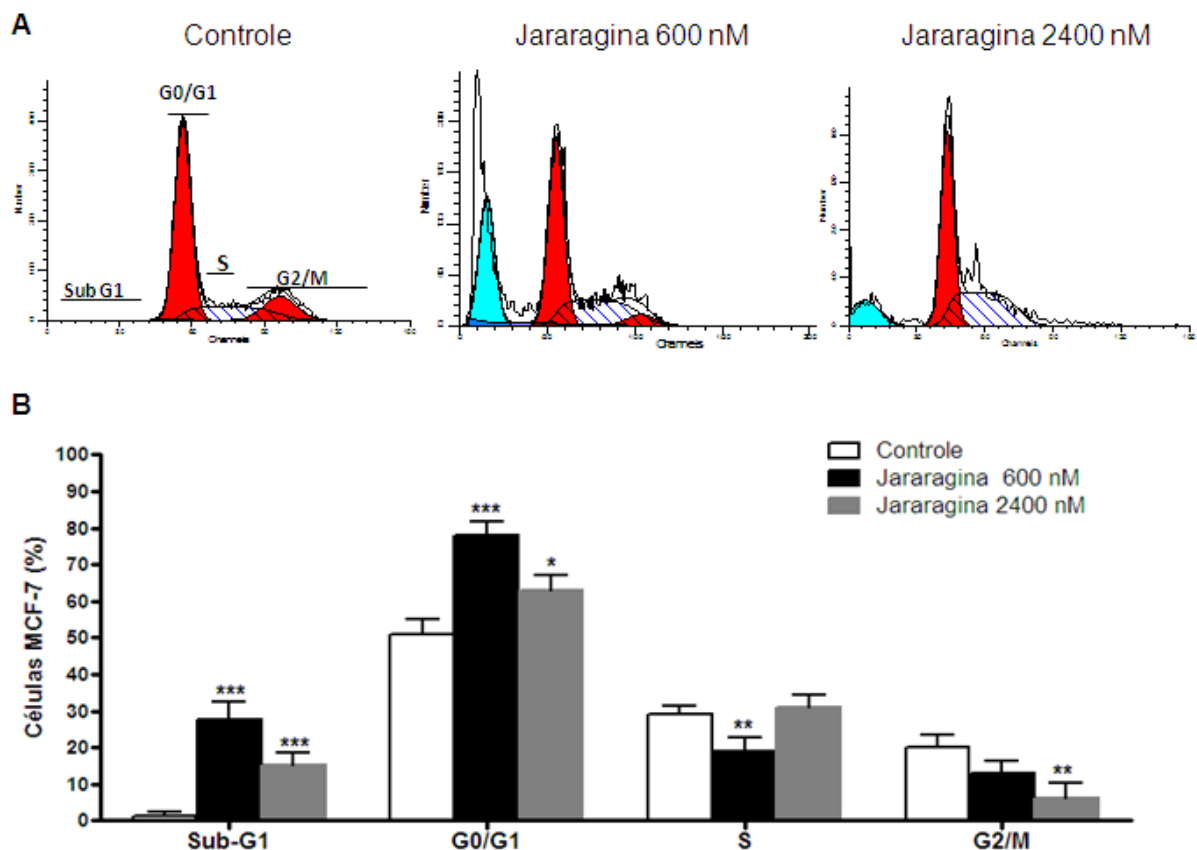
Figura 22 - Avaliação do ciclo celular em células do tumor de mama humano T47D após 24 horas de tratamento com jararagina e grupo controle.



(A) Histogramas representativos da quantificação de DNA obtidos por citometria de fluxo para o grupo controle e tratado com jararagina nas concentrações de 600, 2400 nM, mostrando aumento da fase S nas células tratadas com a jararagina, (B) Gráfico representativo da distribuição das fases do ciclo celular expressos em porcentagem medias \pm dp ($n=3$). Teste de Variância de ANOVA seguido do teste de Tukey Kramer, *($p < 0,5$), ***($p < 0,001$).

Em células tumorais MCF7 o tratamento por 24 horas com jararagina nas concentrações de 600 e 2400 nM, induziu significativo aumento da proporção de células em Sub-G1. A concentração de 600 nM aumentou a proporção de células na fase G0/G1 e diminuiu a fase S quando comparada ao grupo controle (Figura 21). A porcentagem de células em sub-G1 aumentou significativamente a 27% e 15% nas concentrações de 600 e 2400 nM, respectivamente (Figura 23).

Figura 23 - Avaliação do ciclo celular em células do tumor de mama humano MCF-7 após 24 horas de tratamento com jararagina e grupo controle.

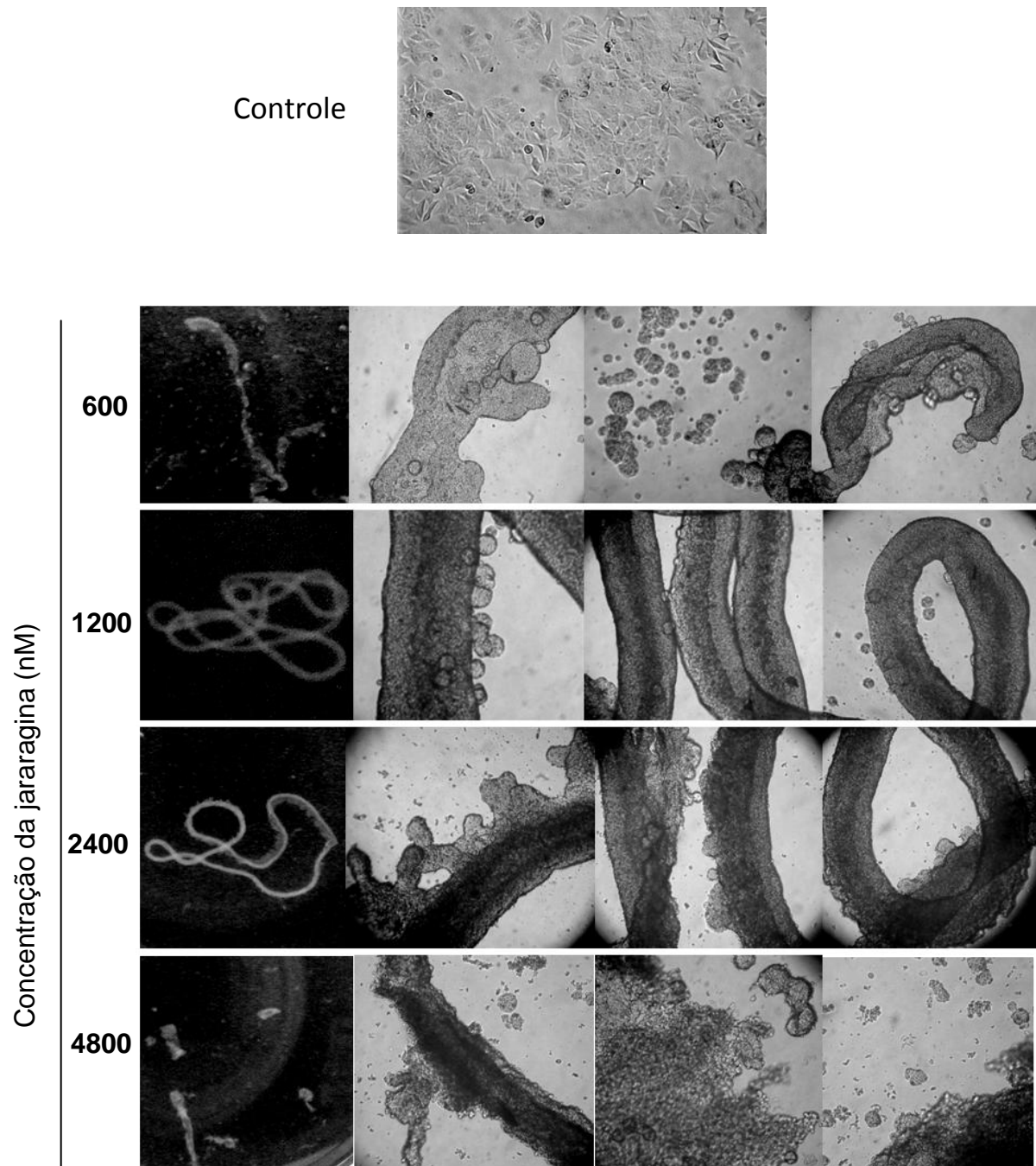


(A) Histogramas representativos da quantificação de DNA obtidos por citometria de fluxo para o grupo controle e tratado com jararagina nas concentrações de 600, 2400 nM, mostrando o aumento das células em sub-G1 nas células tratadas com a jararagina, (B) Gráfico representativo da distribuição das fases do ciclo celular expressos em porcentagem média \pm dp (n=3). Teste de Variância de ANOVA seguido do teste de Tukey Kramer, * ($p < 0.5$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$).

As células tumorais de mama humana MCF7 formaram após o tratamento com jararagina estruturas tubulares visíveis macroscopicamente com compactação celular. Quando observadas ao microscópio invertido a concentração de 600 nM mostra esferóides isolados de tamanhos variáveis e estruturas pouco alongadas dispersas, concentrações de 1200 e 2400 nM mostraram a formação de estruturas tubulares circulares. Na maior concentração o tratamento foi capaz de induzir grande

quantidade de célula em proteólises e debris celulares (Figura 24). As outras linhagens celulares tumorais de mama não produziram *in vitro*, após o tratamento com jararagina, a formação de estruturas esferóides ou do tipo túbulo-acinar.

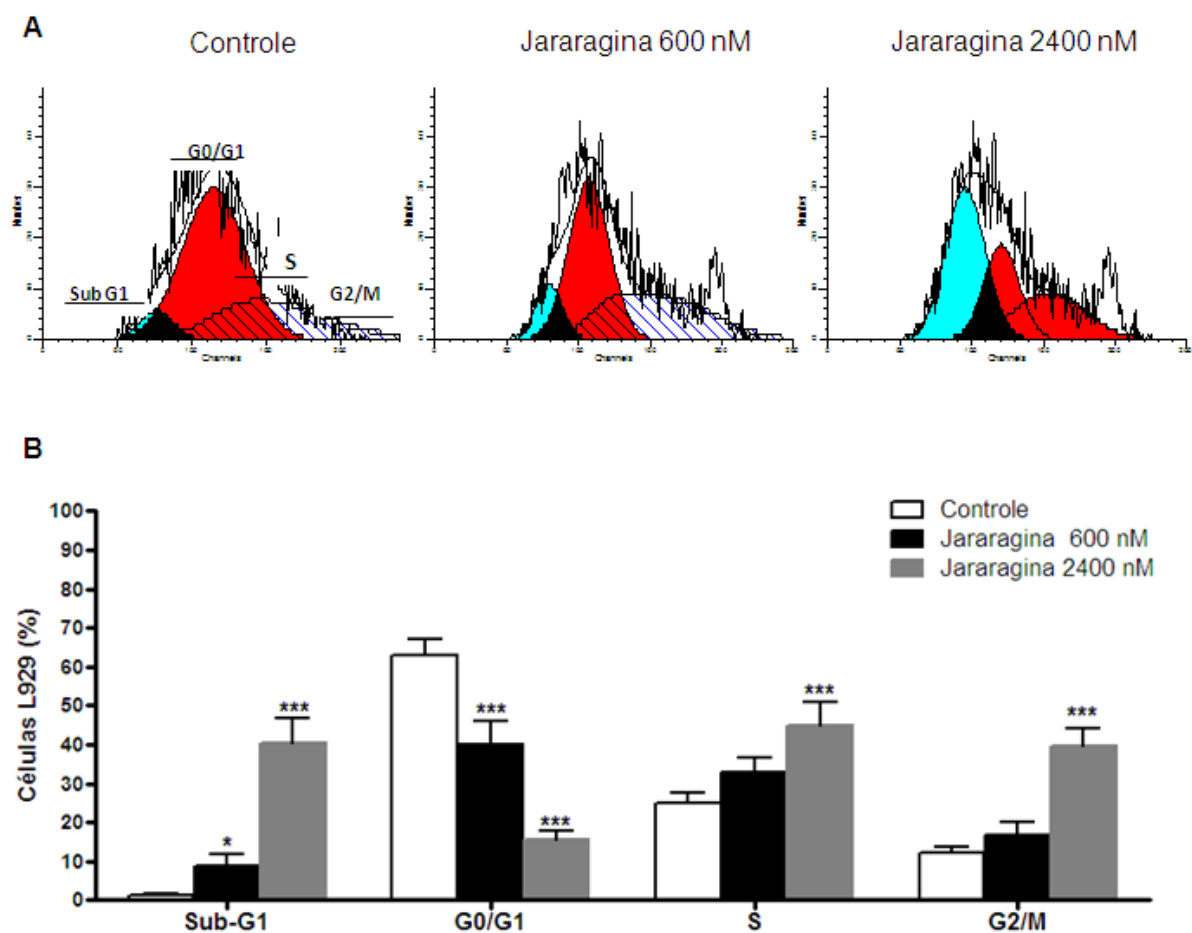
Figura 24 - Formação de estruturas ductais em células tumorais de mama humana MCF7, após o tratamento com jararagina.



Nota-se a formação a formação de estruturas tubulares alongadas após 24 horas de tratamento, e diferentes aspectos microscópicos dos ductos, aumento 40X, controle 200X.

Nos fibroblastos murinos L929, o tratamento com jararagina diminuiu a fase G0/G1 em ambas as concentrações de tratamento, e 2400 nM induziu significativo aumento ($p > 0,001$) na proporção de células em síntese e G2/M, possivelmente diminuindo a resposta proliferativa (Figura 25). A proporção de células em sub-G1 aumentou significativamente a 8 e 40% nas concentrações de 600 e 2400 nM, respectivamente ($***p < 0,001$).

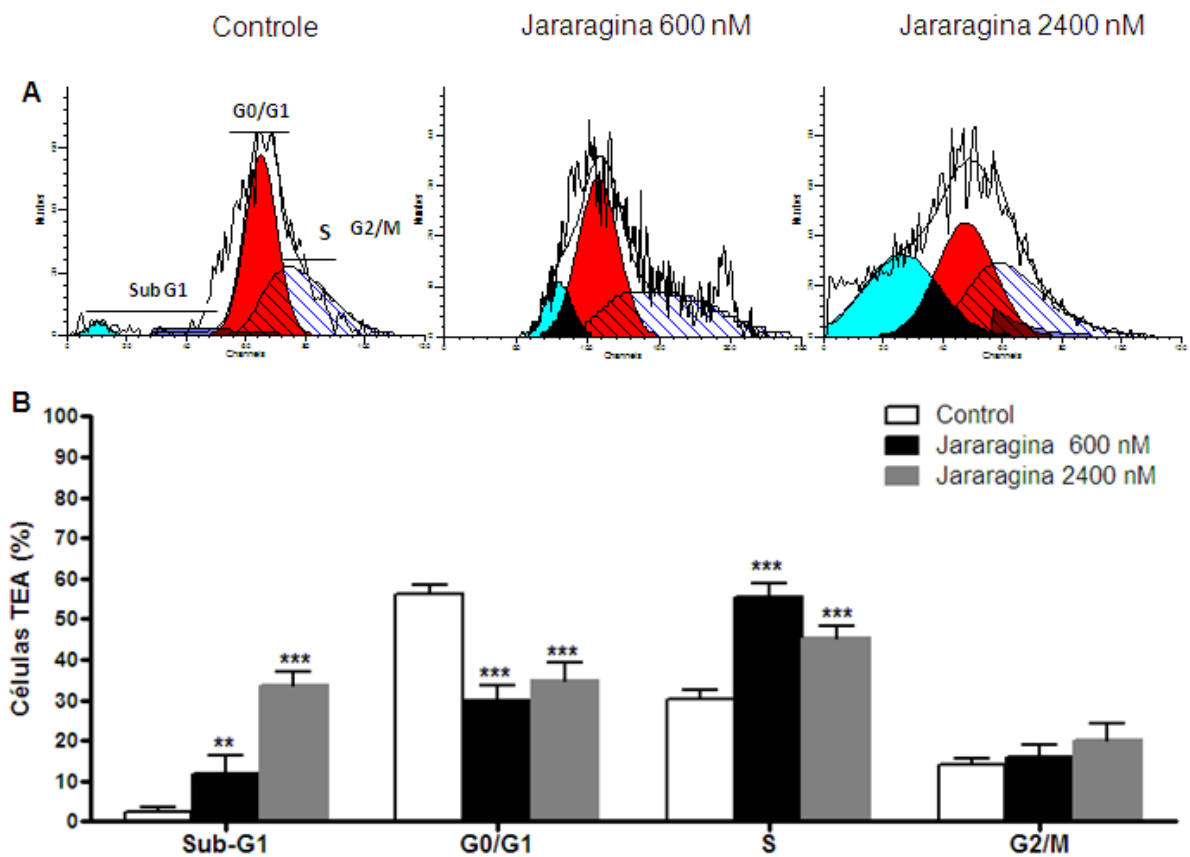
Figura 25 - Avaliação do ciclo celular em células de fibroblasto murino L929, após 24 horas de tratamento com jararagina e grupo controle.



(A) Histogramas representativos da quantificação de DNA obtidos por citometria de fluxo para o grupo controle e tratado com jararagina nas concentrações de 600, 2400 nM, mostrando diminuição da fase G0/G1 e aumento das células em sub-G1 nas células tratadas com a jararagina, (B) Gráfico representativo da distribuição das fases do ciclo celular expresso em porcentagem média \pm dp ($n=3$). Teste de Variância de ANOVA seguido do teste de Tukey Kramer, *($p < 0,5$) e ***($p < 0,001$).

Nas células obtidas do TEA, a jararagina diminuiu a fase G0/G1 e aumentou a fase S (***) $p < 0,001$) para ambas as concentrações de tratamento, estes eventos foram acompanhados pelo aumento de células em sub-G1 ($p < 0,01$) sendo de 11% e 35% para as concentrações de 600 e 2400 nM, respectivamente (Figura 26).

Figura 26 - Avaliação do ciclo celular em células de tumor de Ehrlich ascítico, após 24 horas de tratamento com jararagina e grupo controle.



(A) Histogramas representativos da quantificação de DNA obtidos por citometria de fluxo para o grupo controle e tratado com jararagina nas concentrações de 600, 2400 nM, mostrando aumento da fase S, células em sub-G1, (B) Gráfico representativo da distribuição das fases do ciclo celular expressos em porcentagem médias \pm dp (n=3). Teste de Variância de ANOVA seguido do teste de Tukey Kramer, **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$).

3.2.6 Avaliação da expressão de marcadores em células normais e tumorais por citometria de fluxo

3.2.6.1 Expressão de marcadores de apoptose (Anexina-V) e necrose (PI)

Os efeitos da jararagina sobre as vias de morte celular estão apresentados na Tabela 4.

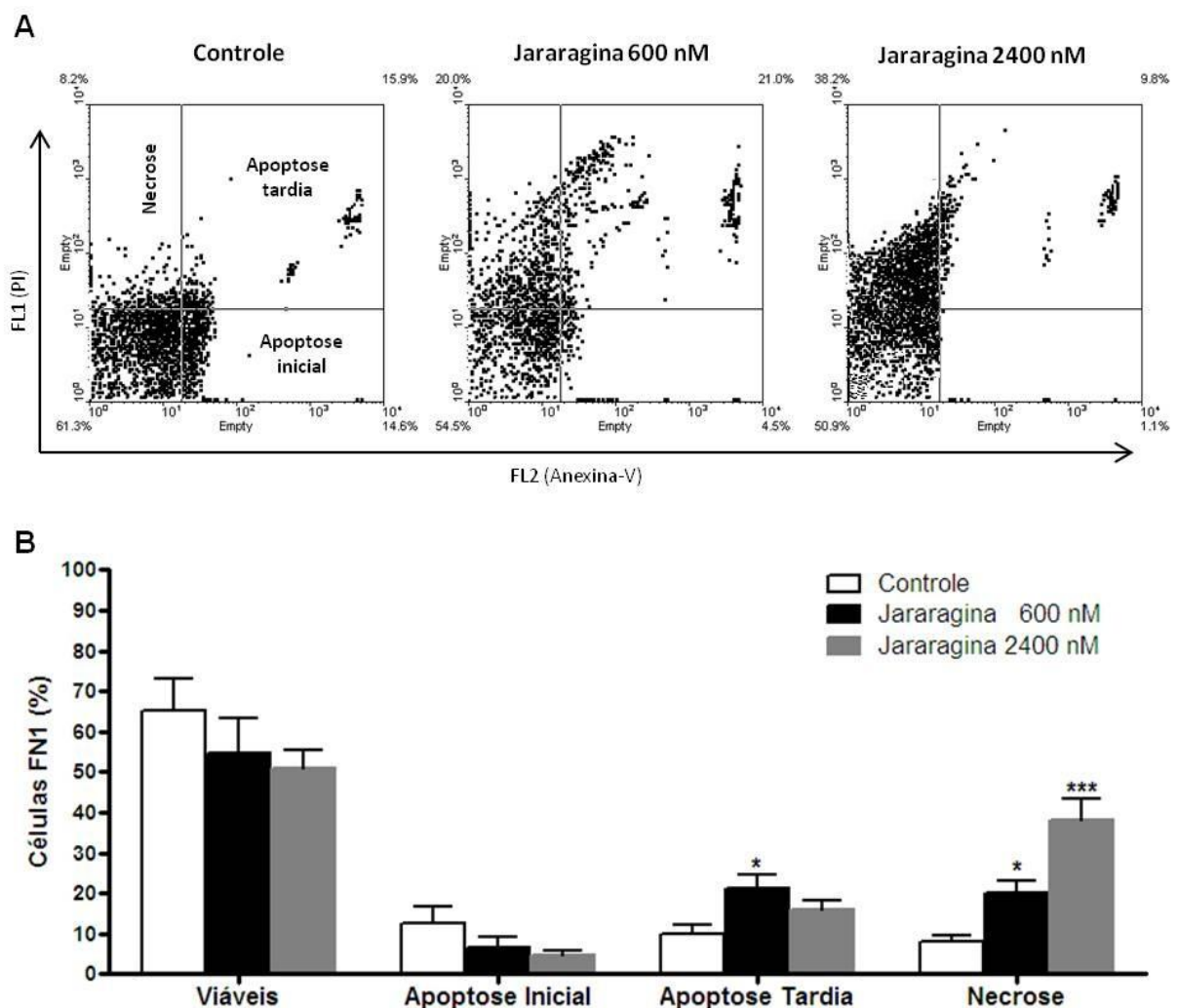
Tabela 4 - Avaliação das proporções de células em apoptose ou necrose nas linhagens celulares após 24 horas de tratamento.

Linhagem celular		Proporção de células (%)					
		Controle		Jararagina 600 nM		Jararagina 2400 nM	
FN1	Viáveis	73	± 7,6	54,5	± 8,7	50,9	± 4,5
	Apoptose Inicial	11,8	± 4,1	6,5	± 2,8	4,6	± 1,3
	Apoptose tardia	7,6	± 2,4	21,4	± 3,5 *	15,8	± 2,3
	Necrose	7,6	± 1,5	20,8	± 3,2*	38,2	± 5,4 ***
HUVEC	Viáveis	75	± 1,3	43,2	± 4,7 ***	44,2	± 4,5 ***
	Apoptose Inicial	1,1	± 4,1	9,4	± 3,8	3,8	± 5,3
	Apoptose tardia	12	± 3,4	25,7	± 3,5 **	24,0	± 5,4**
	Necrose	11	± 2,5	26,5	± 6,4 **	32,3	± 5,7 ***
T47D	Viáveis	72,4	± 11,6	63,3	± 13,7	59,7	± 4,5
	Apoptose Inicial	2,7	± 4,1	9,3	± 1,8	3,7	± 0,9
	Apoptose tardia	13,1	± 2,4	25,2	± 3,5 *	19,4	± 2,3
	Necrose	15,8	± 1,5	22,7	± 3,3	27,2	± 3,8 *
MCF-7	Viáveis	67,1	± 5,6	53,7	± 7,7	44,8	± 2,5 ***
	Apoptose Inicial	9,3	± 3,7	9,4	± 1,1	8,9	± 0,9
	Apoptose tardia	12,8	± 2,4	19,8	± 2,5	17,3	± 2,3
	Necrose	10,8	± 1,5	17,1	± 1,4	29,4	± 2,3 ***
L929	Viáveis	69,8	± 7,6	54,9	± 4,3 **	50,2	± 3,5 ***
	Apoptose Inicial	2,7	± 0,6	3,3	± 1,8	1,8	± 0,9
	Apoptose tardia	10,4	± 1,4	18,8	± 2,5 *	15,1	± 1,3
	Necrose	11,9	± 1,5	26,7	± 1,6 *	28,9	± 3,5 **
TEA	Viáveis	78,4	± 5,6	43,5	± 3,7 ***	42,9	± 3,7 ***
	Apoptose Inicial	1,5	± 0,8	3,9	± 1,2	3,5	± 0,9
	Apoptose tardia	12,1	± 1,4	22,9	± 2,5 **	27,3	± 4,5 ***
	Necrose	8,1	± 1,5	29,7	± 3 ***	31,5	± 5,2 ***

Proporção de células em apoptose inicial (anexina-V +, PI -), apoptose tardia (anexina-V +, PI +), necrose (anexina-V -, PI +), e células viáveis não marcadas (anexina-V -, PI -). expressos em

Nos fibroblastos humanos FN1 o tratamento com jararagina mostrou aumento significativo de morte por necrose dose/dependente em comparação ao controle, com 18% e 34% de células mortas por necrose nas concentrações de 600 e 2400 nM, respectivamente ($p < 0,05$), enquanto a concentração de 600 nM induz morte por apoptose em 20% das células (Figura 27).

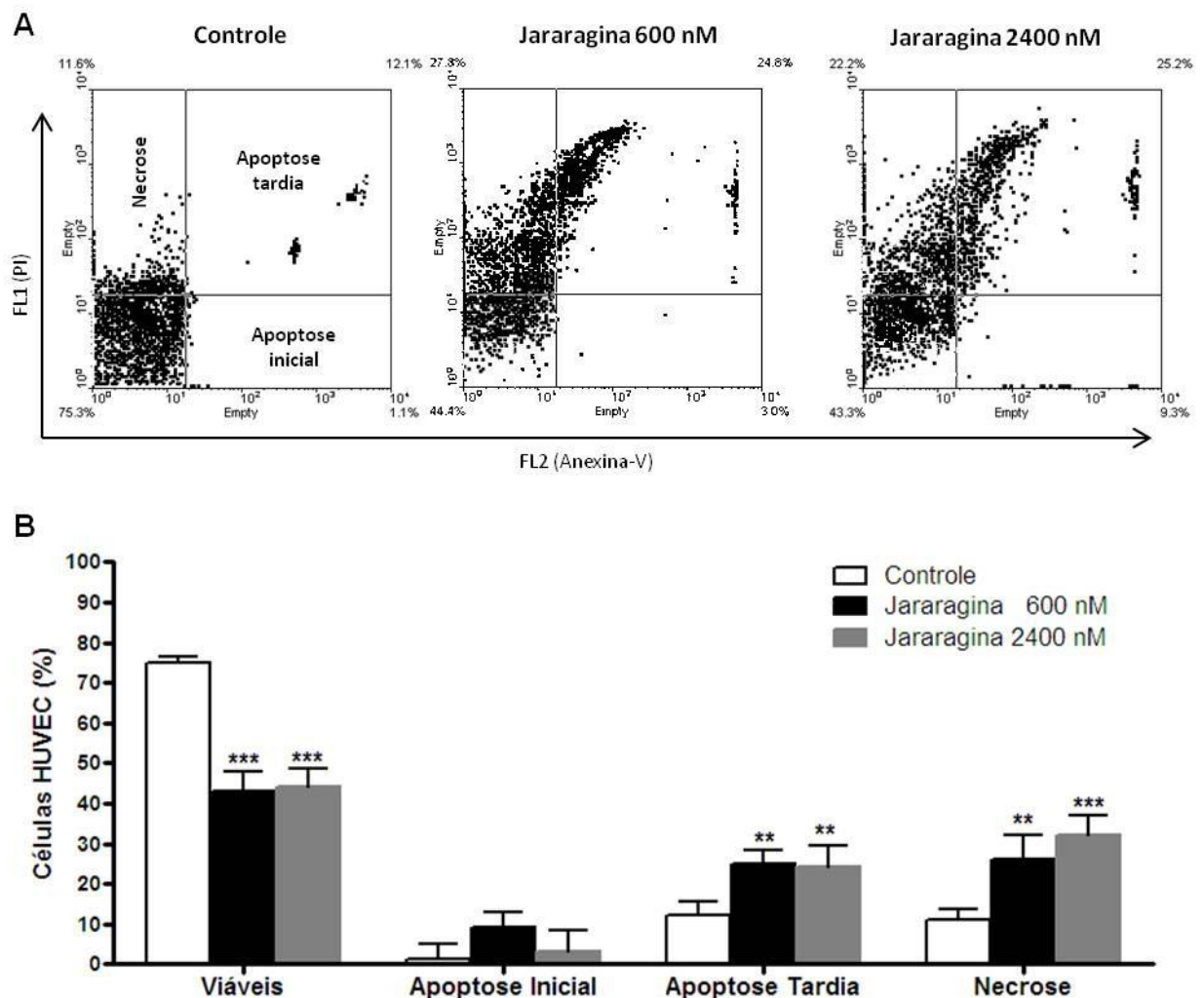
Figura 27 - Expressão de marcadores de morte celular por apoptose (anexina-V) ou necrose (PI) em fibroblasto humano FN1, após 24 horas de tratamento com a jararagina e controle.



(A) Gráficos do tipo *Dot-plot* adquiridos no programa de análise WinMDI2.9 representativos da distribuição da proporção de células em apoptose inicial, apoptose tardia, necrose e células viáveis, obtidos por citometria de fluxo; (B) Gráfico da distribuição das células mortas por apoptose ou necrose, expressos em porcentagem média \pm dp ($n=3$). * representa as diferenças estatísticas significativas ($p < 0,5$), ***($p < 0,001$).

Nas células endoteliais humanas HUVEC, ambas as concentrações de 600 e 2400 nM de jararagina induziram aumento significativo na proporção de células mortas tanto por apoptose tardia como por necrose, quando comparadas ao grupo controle (Figura 28).

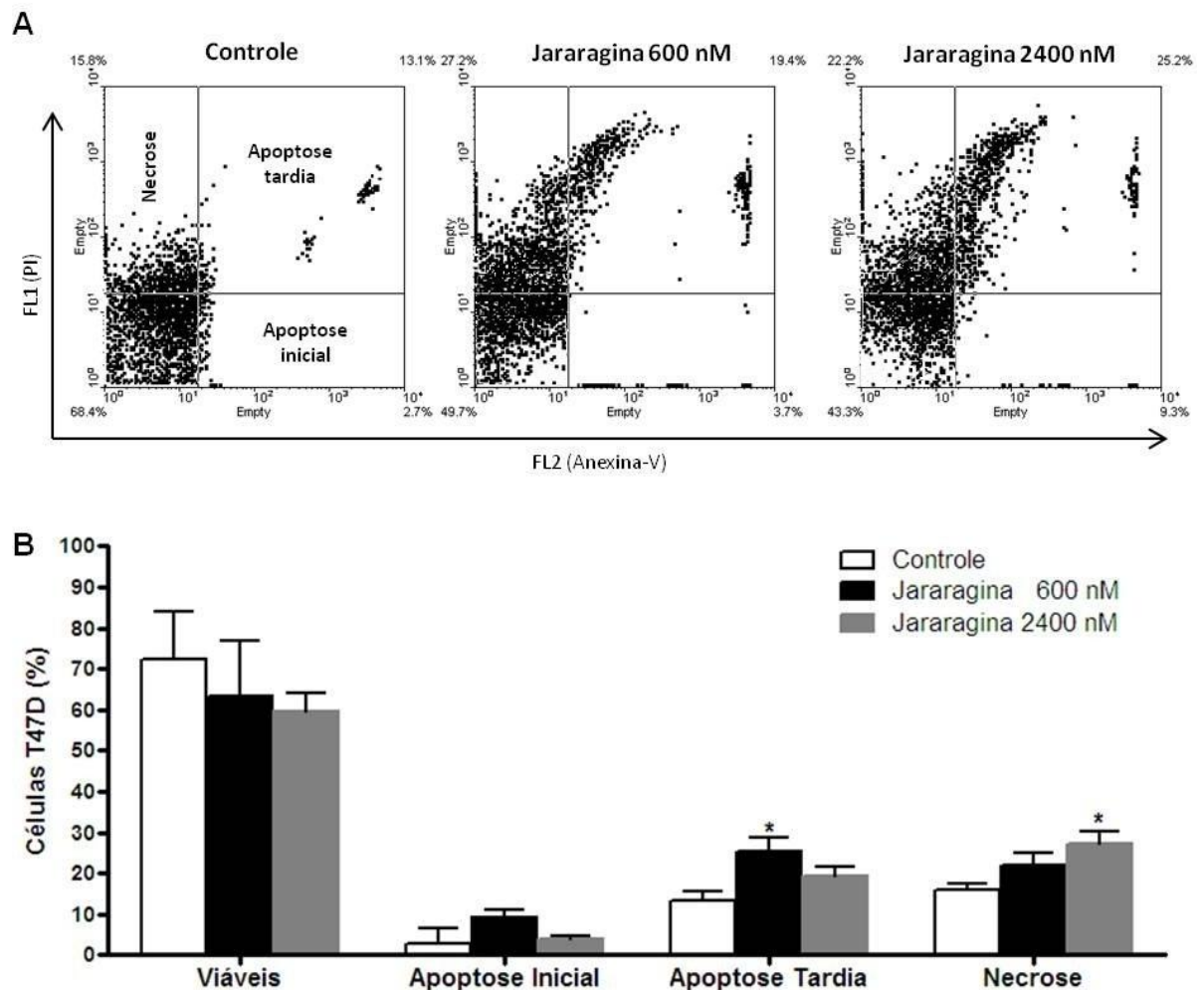
Figura 28 - Expressão de marcadores de morte celular por apoptose (Anexina-V) ou necrose (PI) em células HUVEC após 24 horas de tratamento com a jararagina e controle.



(A) Gráficos do tipo *Dot plot* adquiridos pelo programa CellQuest representativos da distribuição da proporção de células em apoptose inicial, apoptose tardia, necrose e células viáveis. (B) Gráfico da distribuição das células mortas por apoptose ou necrose, expressos em porcentagem média \pm dp (n=3). Diferenças estatísticas significativas representadas por ** (p<0,01) e ***(p<0,001).

Nas células tumorais de mama T47D, o tratamento com a jararagina induziu aumento significativo da proporção de células em apoptose tardia (26%) na concentração de 600 nM e de células mortas por necrose (27%) na concentração de 2400 nM (Figura 29). Entretanto, não houve diferenças significantes na porcentagem de células viáveis dos grupos controle e tratados com jararagina.

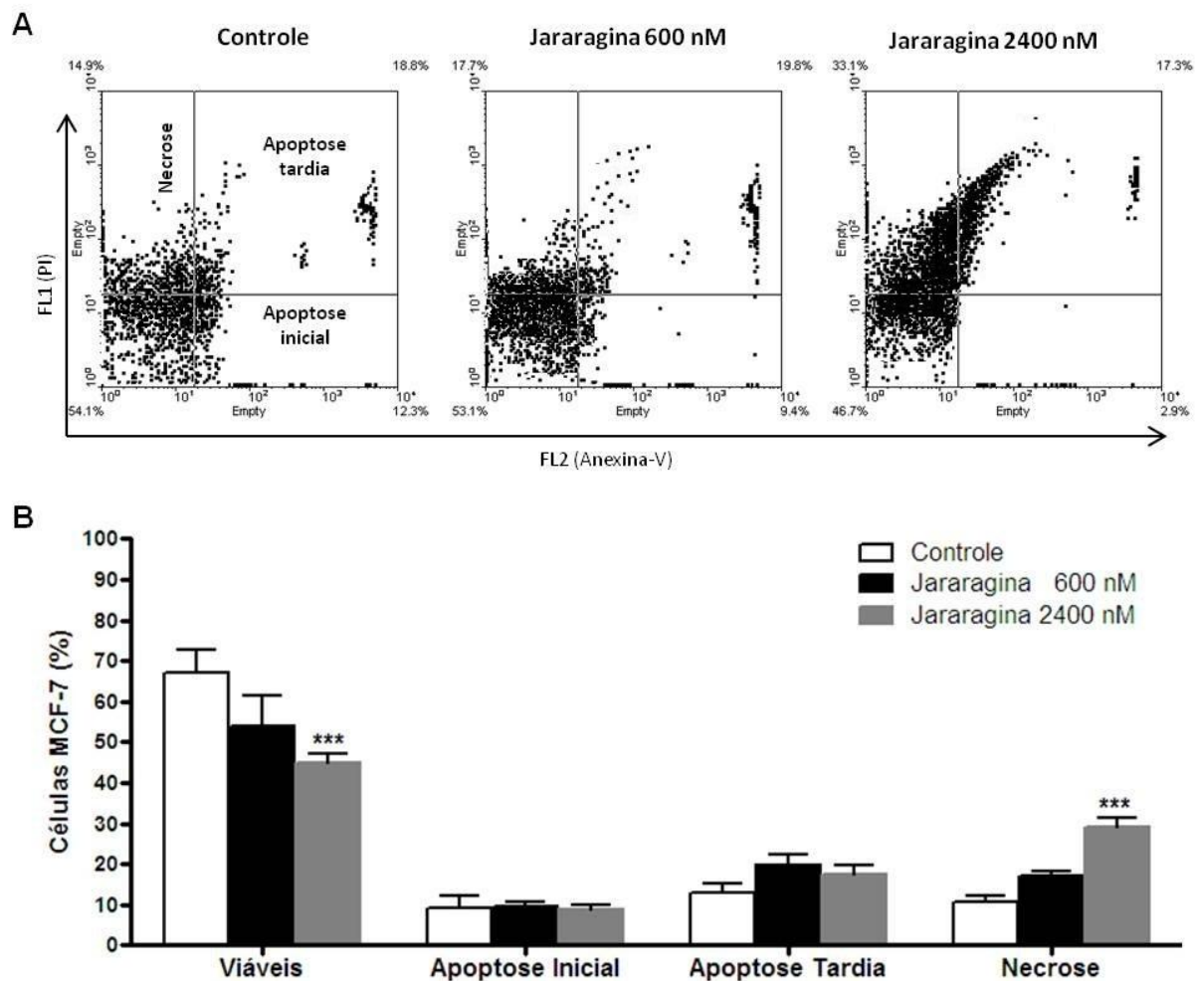
Figura 29 - Expressão de marcadores de morte celular por apoptose (anexina-V) ou necrose (PI) em células T47D após 24 horas de tratamento com a jararagina e controle.



(A) Gráficos do tipo *Dot plot* adquiridos pelo programa CellQuest representativos da distribuição da proporção de células em apoptose inicial, apoptose tardia, necrose e células viáveis, obtidos por citometria de fluxo. (B) Gráfico da distribuição das células mortas por apoptose ou necrose, expressos em porcentagem média \pm dp (n=3). Diferenças estatísticas significativas representadas por * (p<0.5).

Em células tumorais MCF-7, a concentração de 2400 nM de jararagina induziu aumento significativo na proporção de células mortas por necrose até 35%. Não houve alterações significantes nas proporções de células em apoptose em comparação ao controle (Figura 30).

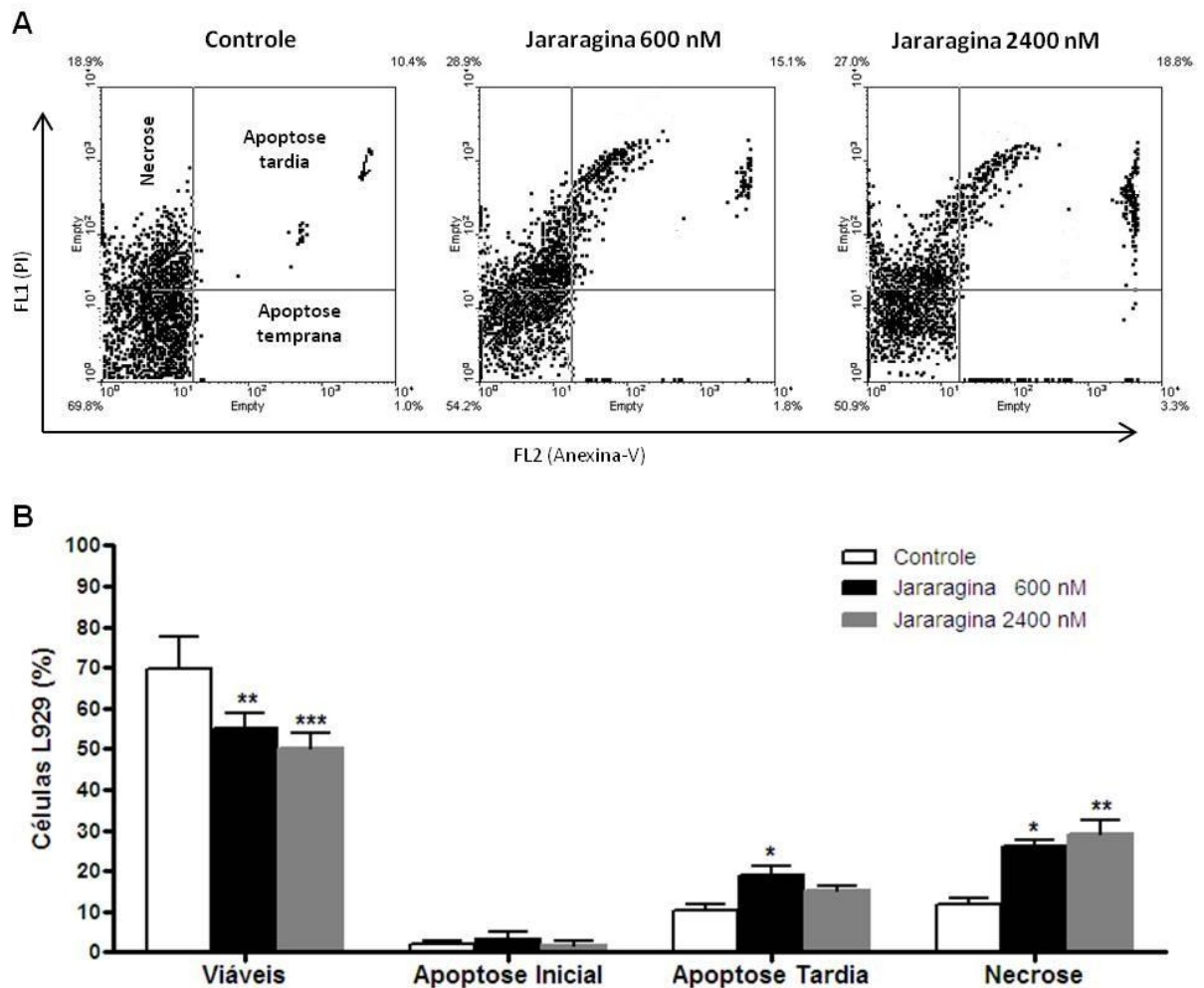
Figura 30 - Expressão de marcadores de morte celular por apoptose (anexina-V) ou necrose (PI) em células tumorais de mama MCF-7, após 24 horas de tratamento com a jararagina e controle.



(A) Gráficos do tipo *Dot plot* adquiridos pelo programa CellQuest representativos da distribuição da proporção de células em apoptose inicial, apoptose tardia, necrose e células viáveis, obtidos por citometria de fluxo. (B) Gráfico da distribuição das células mortas por apoptose ou necrose, expressos em porcentagem média \pm dp (n=3). Diferenças estatísticas significativas representadas por ***($p < 0,001$).

Na linhagem de fibroblastos murinos L929, a jararagina na concentração de 600 nM aumentou significativamente a proporção de células em apoptose tardia (18,8% \pm 2,9) como também mortas por necrose (26% \pm 2,2), por outro lado, a concentração de 2400 nM de jararagina foi capaz de induzir o aumento de 30% de células mortas por necrose (Figura 31).

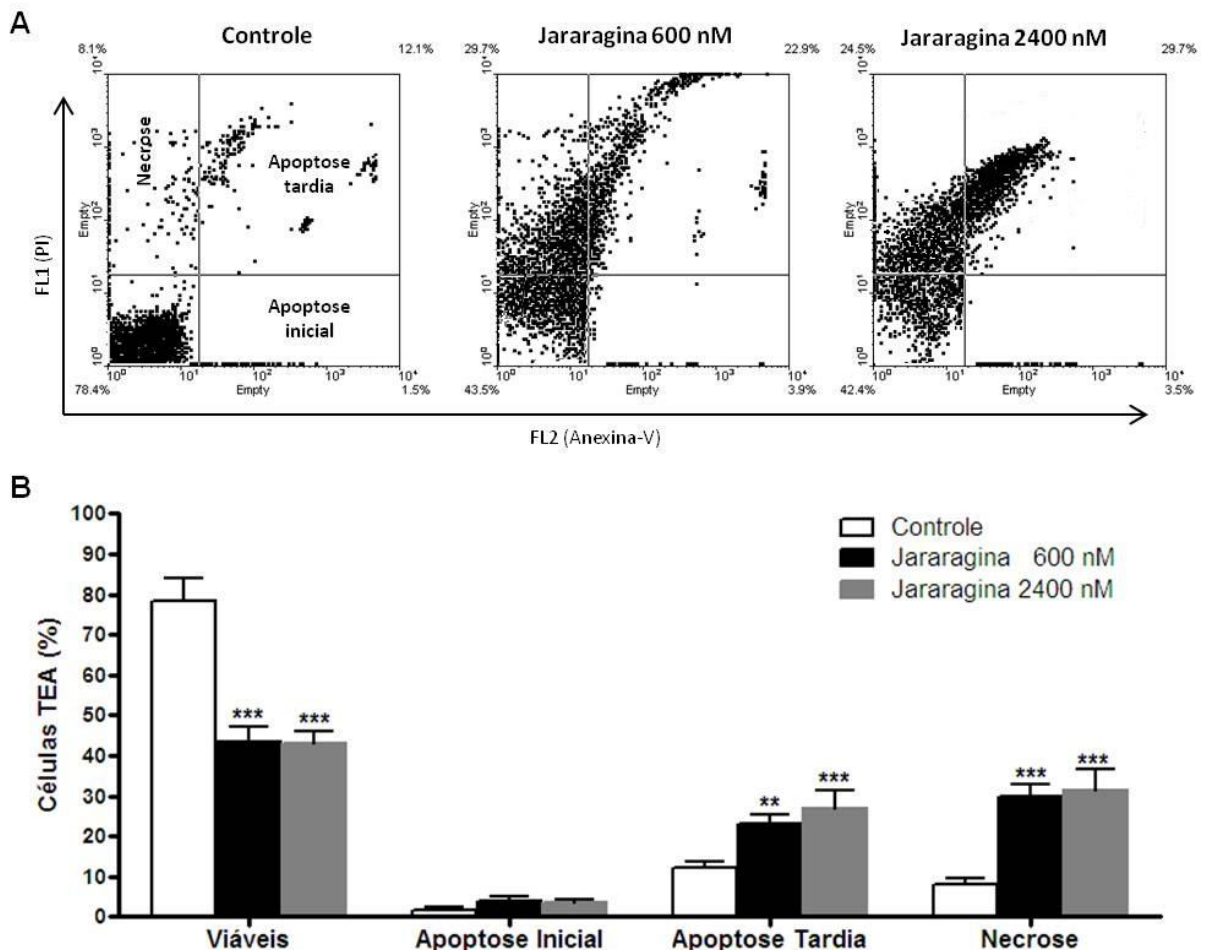
Figura 31 - Expressão de marcadores de morte celular por apoptose (anexina-V) ou necrose (PI) em fibroblasto murino L929, após 24 horas de tratamento com a jararagina e controle.



(A) Gráficos do tipo *Dot plot* adquiridos pelo programa CellQuest representativos da distribuição da proporção de células em apoptose inicial, apoptose tardia, necrose e células viáveis, obtidos por citometria de fluxo. (B) Gráfico da distribuição das células mortas por apoptose ou necrose, expressos em porcentagem média \pm dp (n=3). Diferenças estatísticas significativas representadas por * (p<0.5), ** (p<0,01) e *** (p<0,001).

Nas células de TAE o tratamento com jararagina mostrou um padrão semelhante para ambas as concentrações de 600 e 2400 nM, com aumento significativo das células em apoptose tardia (25%), como de células mortas por necrose (30%). Estas alterações foram acompanhadas pela diminuição da proporção de células viáveis. O grupo controle apresentou 78,4% de células viáveis, enquanto os grupos tratados com jararagina apresentaram redução significativa para 43,5% e 42,9%, respectivamente, nas concentrações de 600 ou 2400 nM (Figura 32).

Figura 32 - Expressão de marcadores de morte celular por apoptose (Anexina-V) ou necrose (PI) em células tumorais TEA, após 24 horas de tratamento com a jararagina e controle.

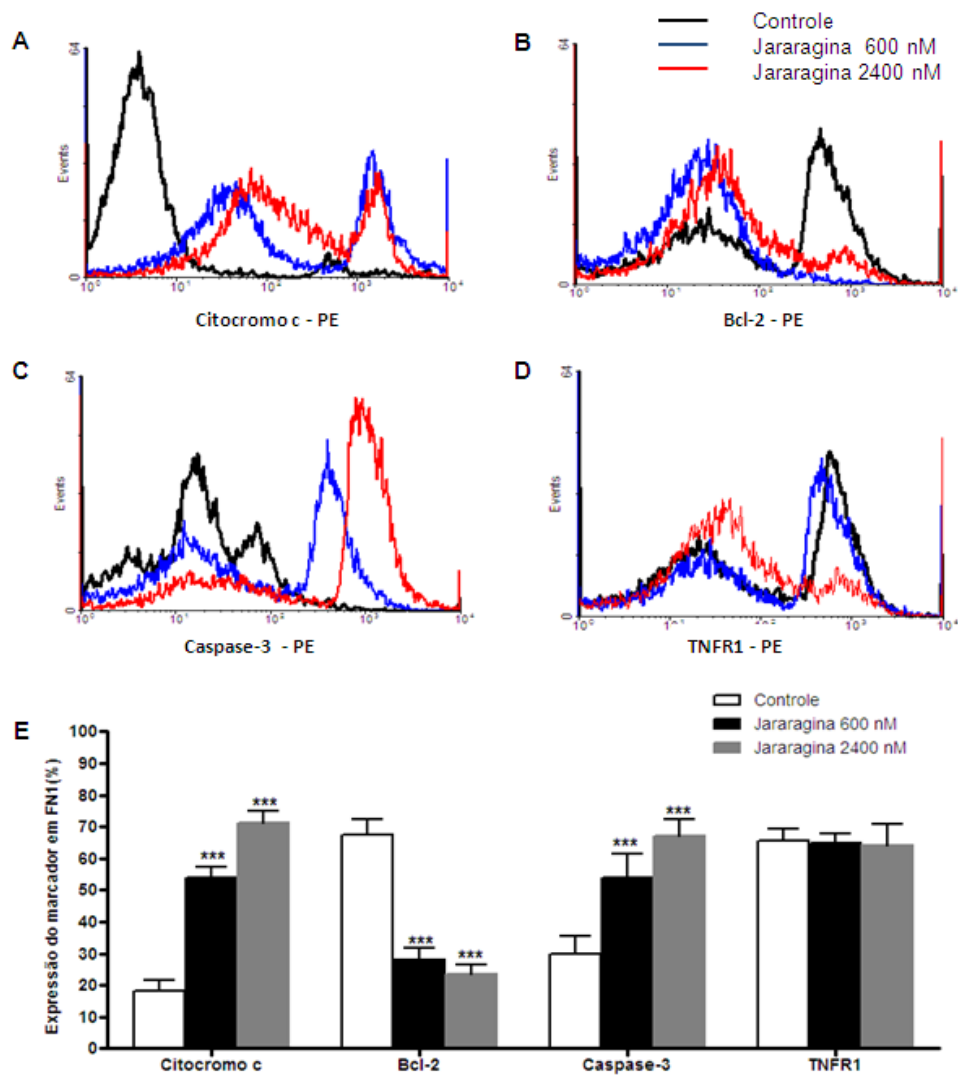


(A) Gráficos do tipo *Dot plot* adquiridos pelo programa CellQuest representativos da distribuição da proporção de células em apoptose inicial, apoptose tardia, necrose e células viáveis, obtidos por citometria de fluxo. (B) Gráfico da distribuição das células mortas por apoptose ou necrose, expressos em porcentagem média \pm dp (n=3). Diferenças estatísticas significativas representadas por ** (p<0,01) e *** (p<0,001).

3.2.6.2 Expressão de marcadores celulares

Em células FN1, após 24 horas de tratamento com a jararagina nas concentrações de 600 e 2400 nM, observa-se aumento significativo ($p < 0,001$) na expressão dos marcadores citocromo-c, caspase-3 clivada, acompanhados de diminuição da proteína anti-apoptótica Bcl-2. Não houve alterações quantitativas na expressão do TNFR1 (Figura 33).

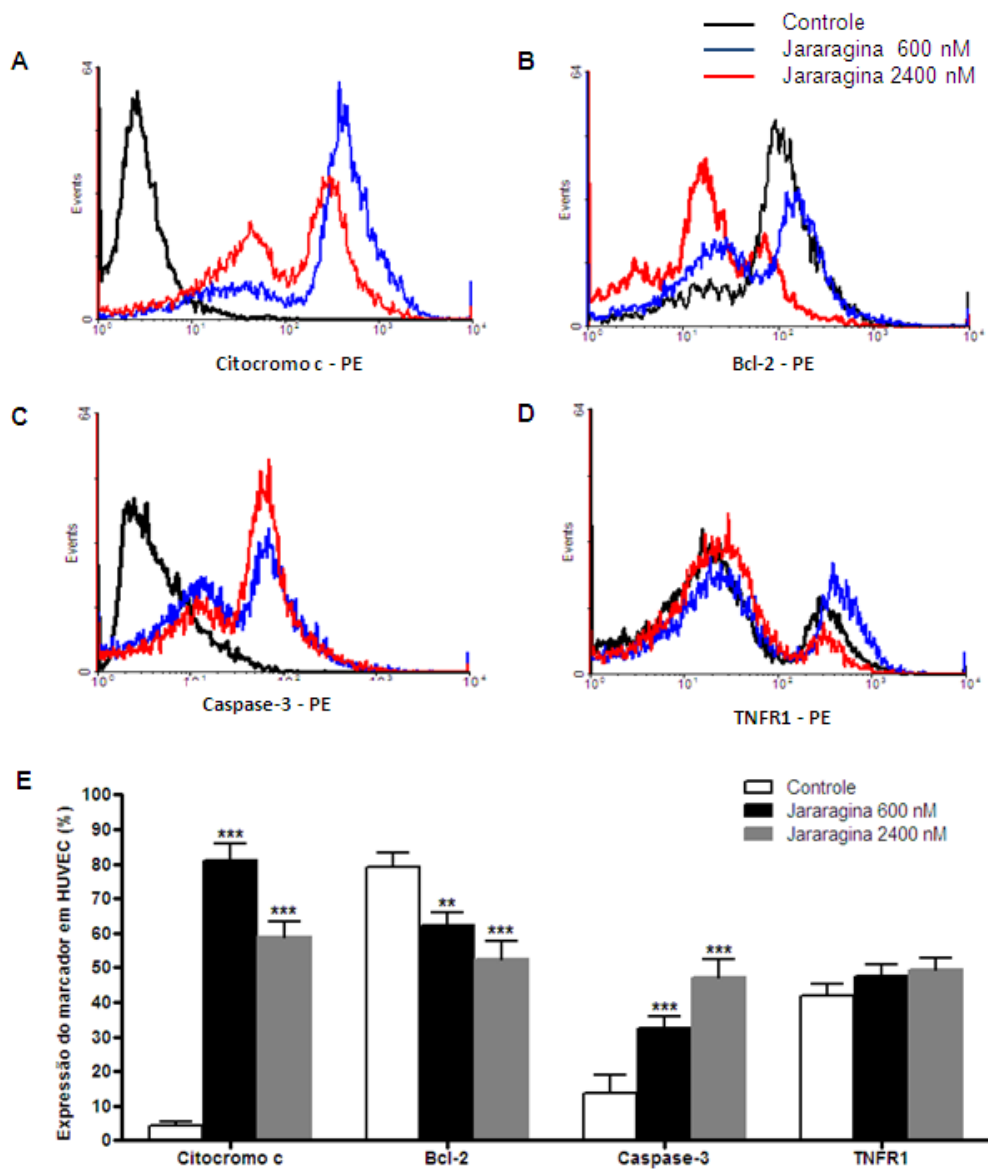
Figura 33 - Expressão da proteína citocromo c, Bcl-2, caspase-3 e TNFR1 por citometria de fluxo em fibroblastos FN1 tratados com jararagina nas concentrações de 600 e 2400 nM e controle.



Histograma *overlay* obtido pelo programa WinMDI 2.9 da expressão de proteínas citocromo c (A), Bcl-2 (B), caspase-3 (C) e receptor TNFR1 (D). Gráfico de barras da porcentagem de células positivas à expressão do marcador (E). Diferenças estatísticas pelo teste de Variância ANOVA de uma via representada por *** ($p < 0,0001$).

Em células HUVEC, a jararagina induz significativo aumento na expressão de citocromo-c, caspase-3 clivada e diminuição da proteína anti-apoptótica Bcl-2, em ambas as concentrações de 600 e 2400 nM de jararagina, após 24 horas de tratamento (Figura 34). Não houve alterações quantitativas na expressão do TNFR1 entre os grupos tratados com jararagina e controle.

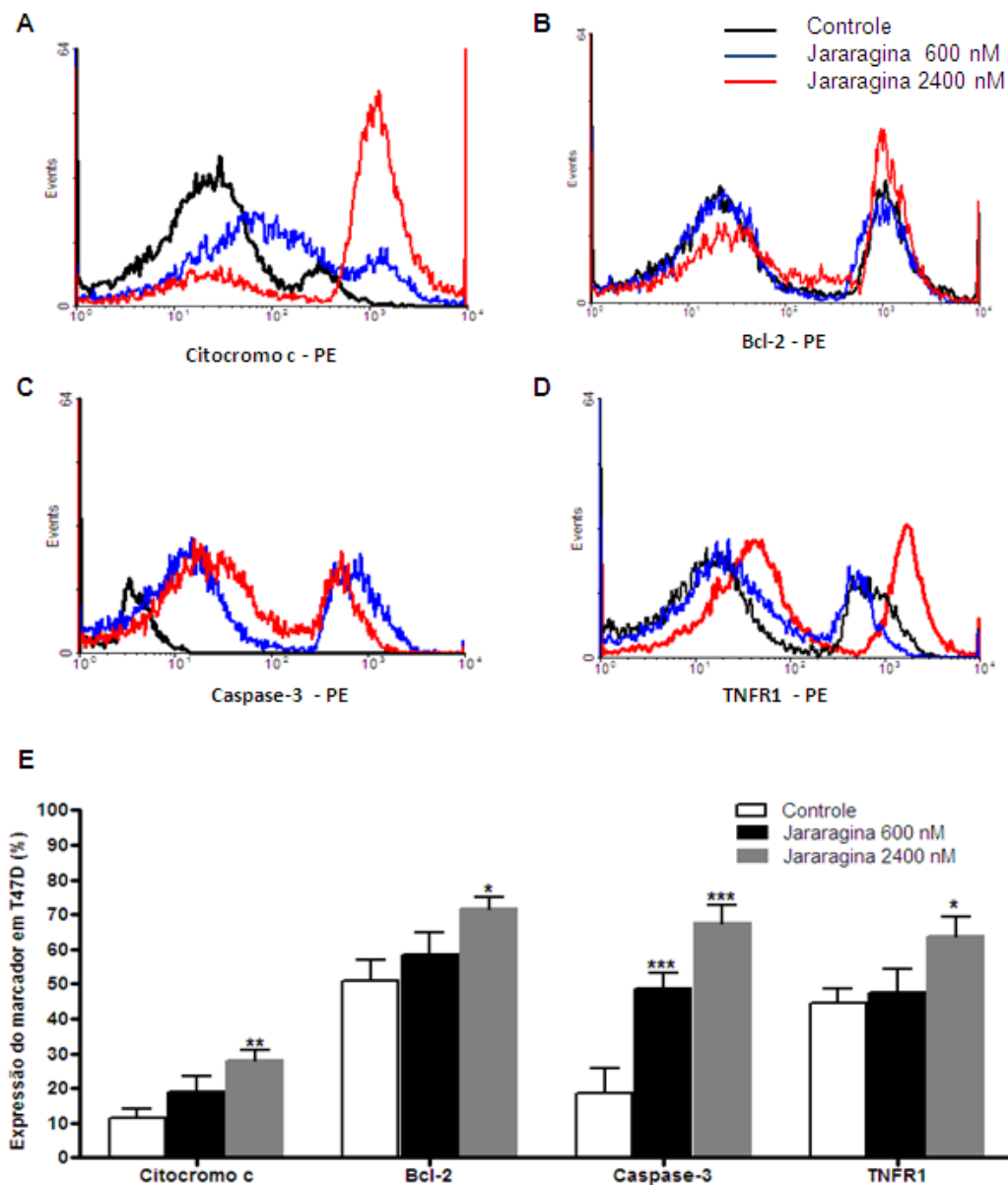
Figura 34 - Expressão da proteína citocromo c, Bcl-2, caspase-3 e TNFR1 por citometria de fluxo em células HUVEC tratadas com jararagina nas concentrações de 600 e 2400 nM e controle.



Histograma *overlay* da expressão de proteínas citocromo c (A), Bcl-2 (B), caspase-3 fosforilada (C) e receptor TNFR1 (D). Gráfico de barras da porcentagem de células positivas à expressão do marcador (E). Diferenças estatísticas obtidas pelo teste de Variância de ANOVA de uma via representadas por ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$).

Em células T47D, ambas as concentrações de 600 e 2400 nM de jararagina induziram aumento na expressão de caspase-3 clivada. Na concentração de 2400 nM ocorreu aumento significativo na liberação de citocromo-c e do receptor TNFR1 com diminuição significativa da proteína anti-apoptótica Bcl-2, após 24 horas de tratamento, como apresentada na figura 35.

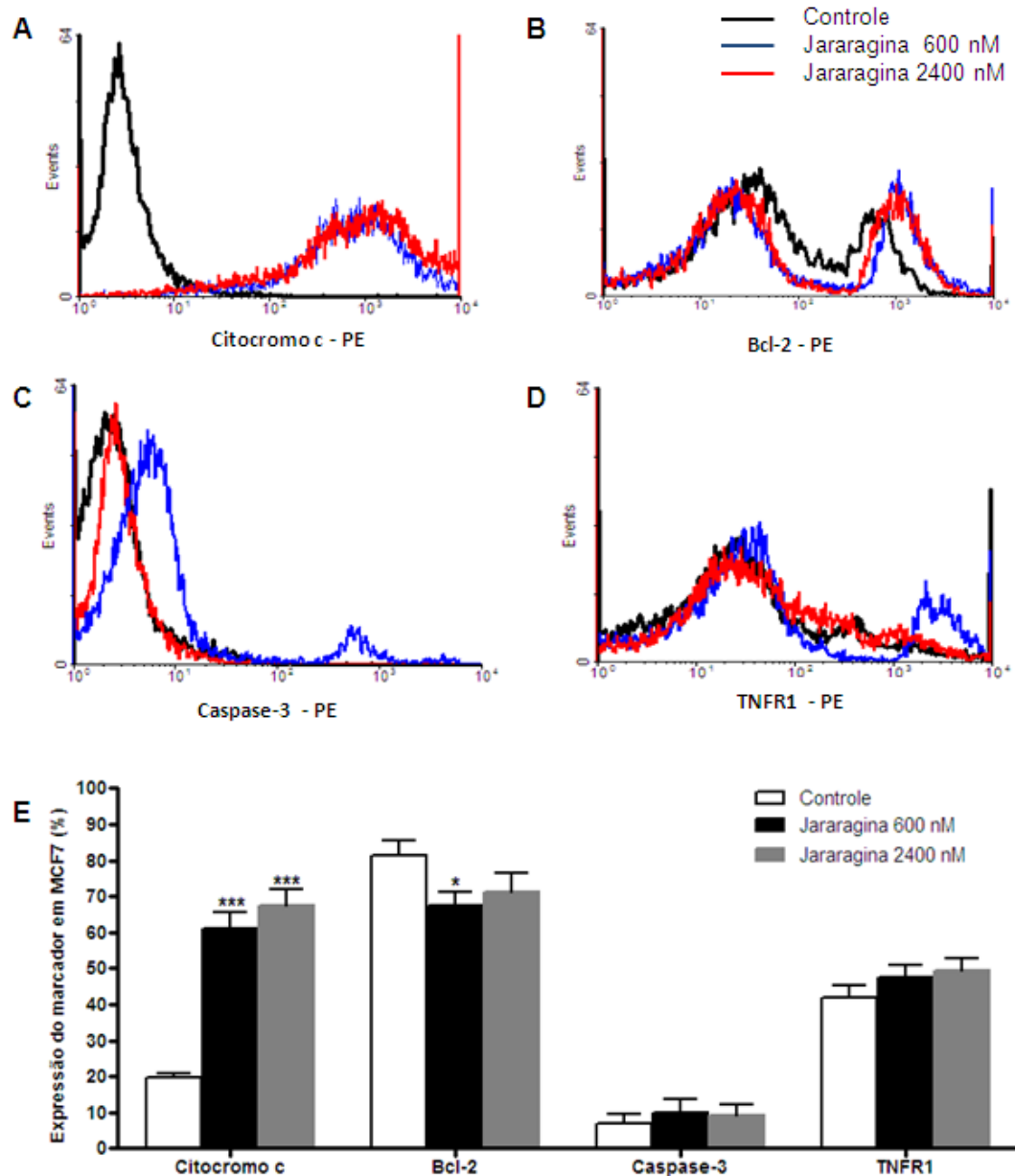
Figura 35 - Expressão da proteína citocromo c, Bcl-2, caspase-3 e TNFR1 por citometria de fluxo em células T47D tratadas com jararagina nas concentrações de 600 e 2400 nM e controle.



Histograma *overlay* da expressão de proteínas citocromo c (A), Bcl-2 (B), caspase-3 fosforilada (C) e receptor TNFR1 (D). Gráfico de barras da porcentagem de células positivas à expressão do marcador (E). Diferenças estatísticas pelo teste de Variância de ANOVA de uma via representadas por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$).

Em células MCF-7, a jararagina em ambas as concentrações induz significativo aumento na expressão do citocromo-c e diminuição de Bcl-2 na concentração de 600 nM. Não foram observadas diferenças na expressão de caspase-3 clivada e TNFR1 em ambas as concentrações de jararagina, após 24 horas de tratamento (Figura 36).

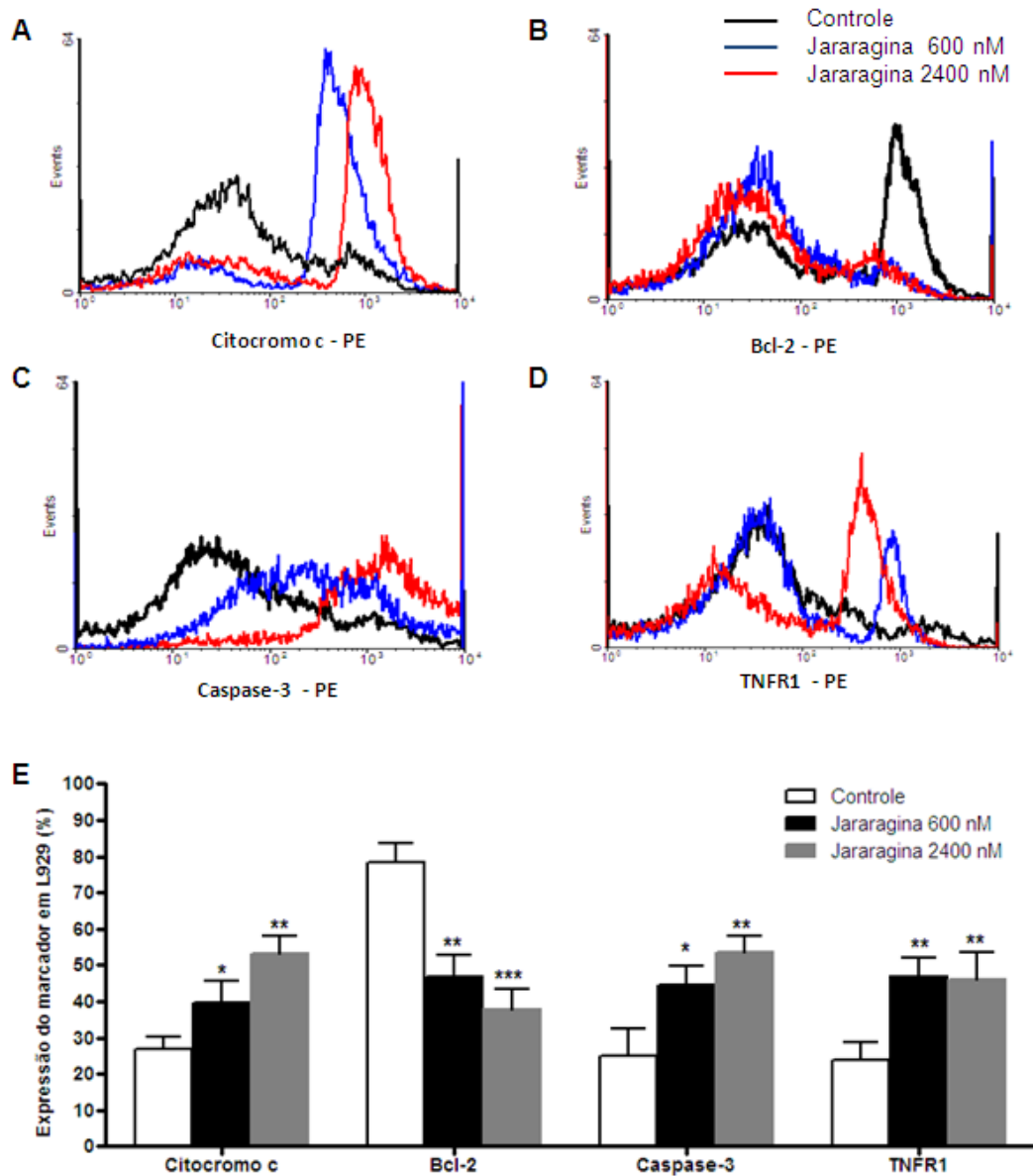
Figura 36 - Expressão da proteína citocromo c, Bcl-2, caspase-3 fosforilada e TNFR1 por citometria de fluxo em células MCF-7 tratadas com jararagina nas concentrações de 600 e 2400 nM e controle.



Histograma *overlay* da expressão de proteínas citocromo c (A), Bcl-2 (B), caspase-3 (C) e receptor TNFR1 (D). Gráfico de barras da porcentagem de células positivas à expressão do marcador (E), diferenças estatísticas pelo análise de Variância ANOVA de uma via representadas por * (p < 0,05) e *** (p < 0,001).

Em fibroblasto murino L929, a jararagina induziu aumento significativo na expressão dos marcadores citocromo-c, caspase-3 clivada e TNFR1, além de diminuição significativa da expressão do Bcl-2 em ambas as concentrações de 600 e 2400 nM, após 24 horas de tratamento. Os histogramas e a porcentagem de expressão dos marcadores estão apresentados na figura 37.

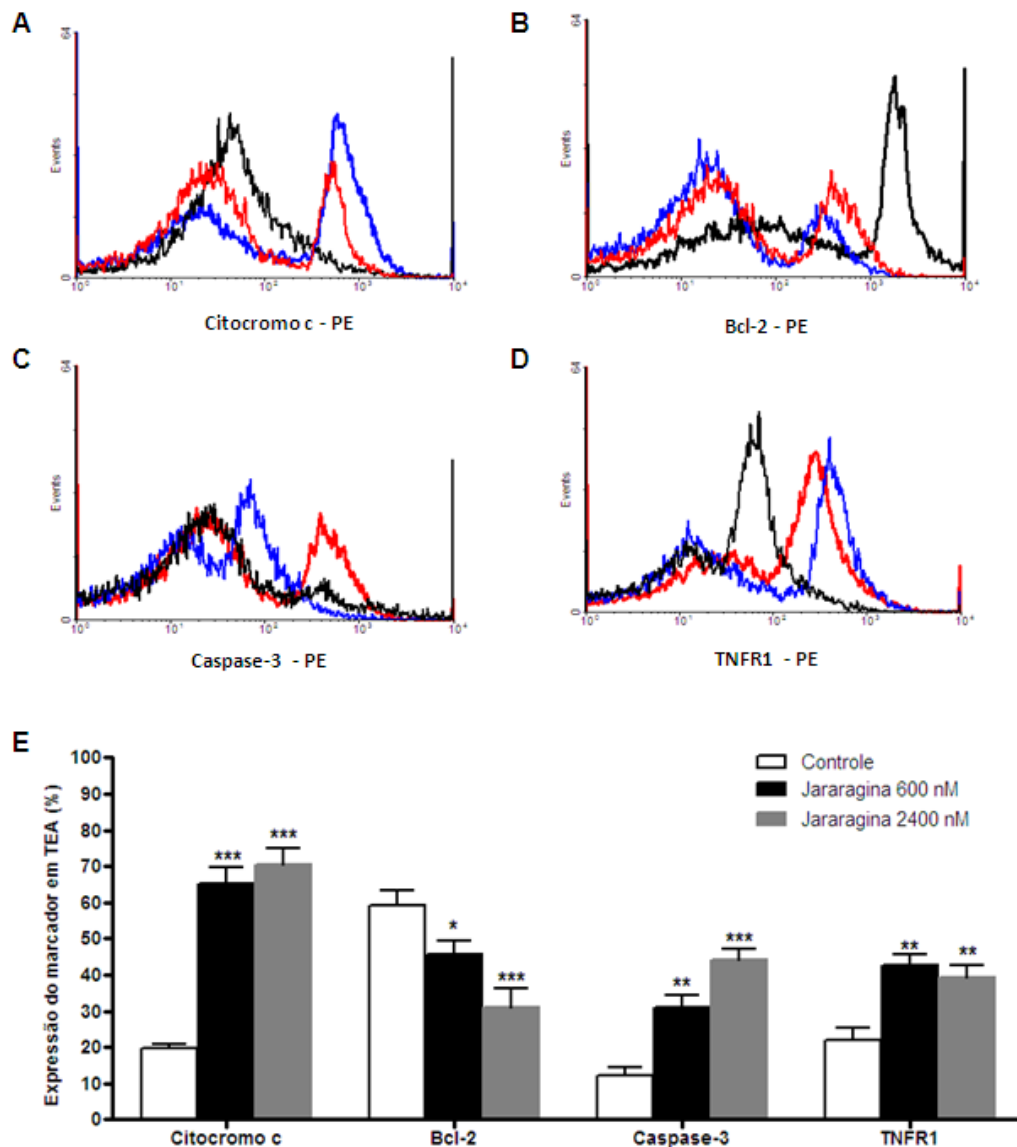
Figura 37 - Expressão da proteína citocromo c, Bcl-2, caspase-3 e TNFR1 por citometria de fluxo em células L929 tratadas com jararagina nas concentrações de 600 e 2400 nM e controle.



Histograma *overlay* da expressão de proteínas citocromo c (A), Bcl-2 (B), caspase-3 (C) e receptor TNFR1 (D). Gráfico de barras da porcentagem de células positivas à expressão do marcador (E), Diferenças estatísticas pelo análise de Variância ANOVA de uma via representadas por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$).

Em células do Tumor de Ehrlich ascítico (TEA), o tratamento com a jararagina induziu aumento significativo na expressão dos marcadores citocromo-c, caspase-3 clivada, e TNFR1, e diminuição de Bcl-2 em ambas as concentrações, após 24 horas de tratamento com jararagina nas concentrações de 600 e 2400 nM por 24 horas, como mostrado na figura 38. Em comparação aos fibroblastos L929.

Figura 38 - Expressão da proteína citocromo c, Bcl-2, caspase-3 e TNFR1 em cultura de células L929 tratadas com jararagina nas concentrações de 600 e 2400 nM e grupo controle.



Histograma *overlay* da expressão de proteínas citocromo c (A), Bcl-2 (B), caspase-3 (C) e receptor TNFR1 (D). Gráfico de barras da porcentagem de células positivas à expressão do marcador (E), diferenças estatísticas pela análise de Variância de ANOVA de uma via representadas por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$).

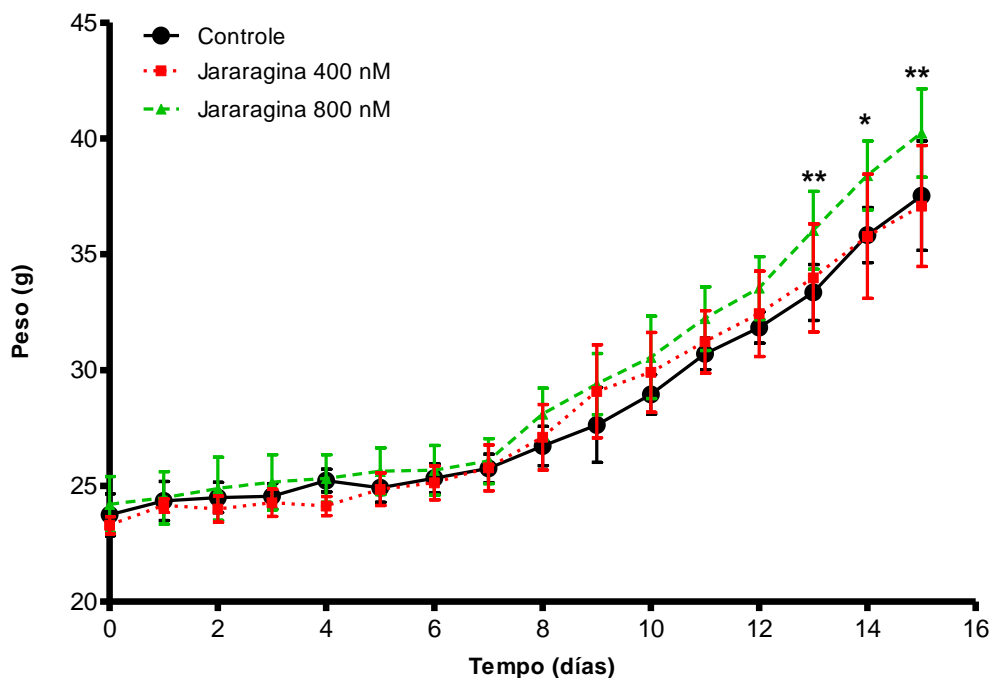
3.3 Avaliação *in vivo* dos efeitos da jararagina

3.3.1 Modelo experimental do Tumor de Ehrlich ascítico (TEA)

3.3.1.1 Peso dos animais e volume do tumor

Após a implantação das células tumorais em camundongos BALB/c, o crescimento do tumor na cavidade abdominal foi avaliado pelo aumento do peso dos animais com TEA. Os resultados mostraram que o tratamento com a jararagina na concentração de 400 nM não apresentou diferenças estatísticas significativas no ganho do peso corporal, quando comparado ao grupo controle. Entretanto, o grupo tratado com jararagina na concentração de 800 nM mostrou aumento significativo do peso em média de $8 \pm 1,4\%$ a partir do 13º dia de tratamento, quando comparado ao grupo controle (Figura 39).

Figura 39 - Variação do peso dos camundongos BALB/c portadores do TEA



Após a inoculação das células de TEA, os camundongos BAL/c receberam tratamento diário com jararagina 400, 800 nM ou solução salina grupo controle pela via intraperitoneal. Os animais foram pesados diariamente, os dados expressos como média \pm dp e analisados pelo teste de Variância ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni, * ($p < 0.05$) e ** ($p < 0.01$); (n=6).

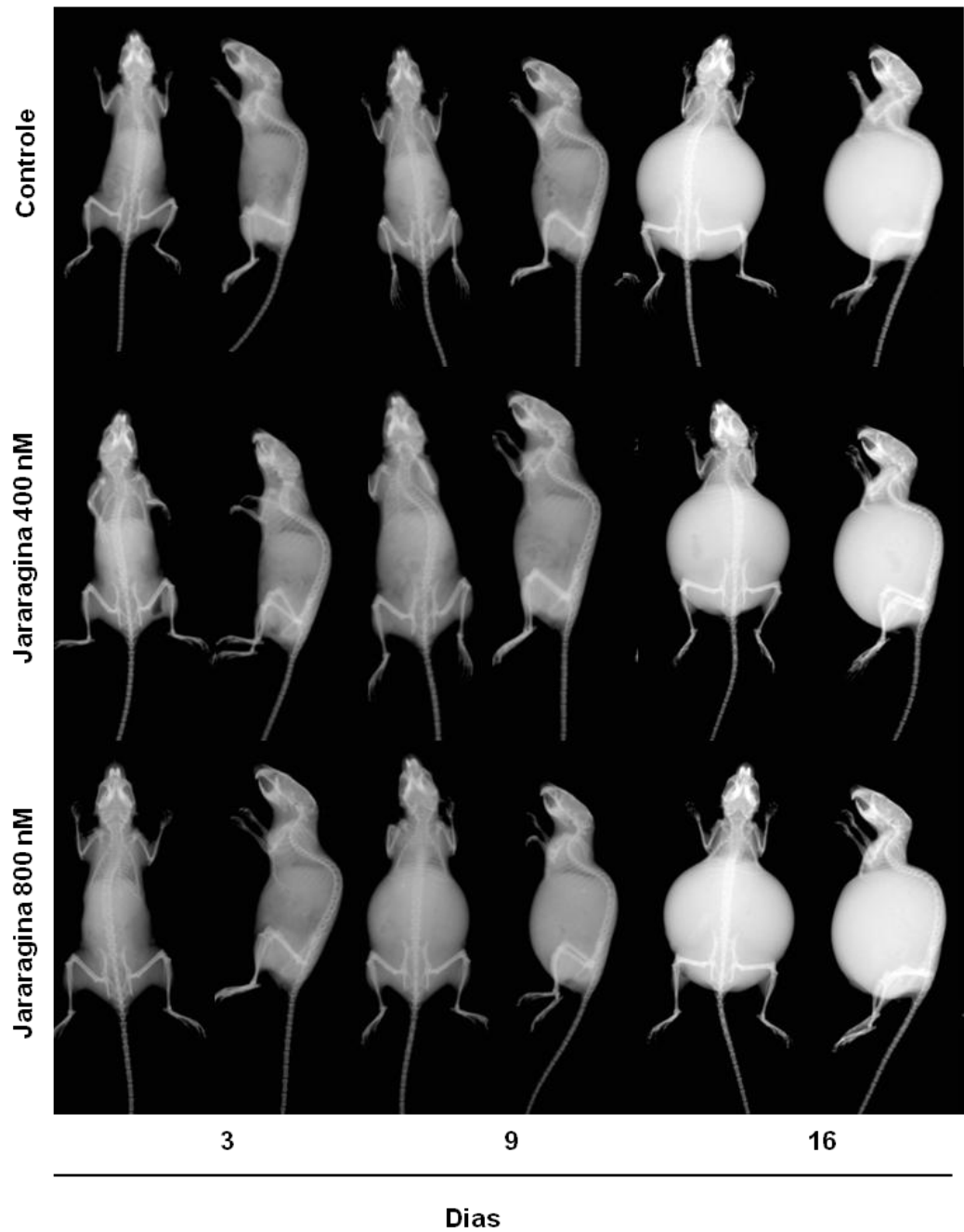
A visualização da distensão ventral e lateral da cavidade abdominal obtidas pelo sistema de captura de imagem MS FX PRO nos dias 3, 9, e 16 após a inoculação das células tumorais, permitiu a obtenção das dimensões de comprimento e largura para o cálculo do volume do tumor como descrito na seção 2.3.3. Os resultados da Tabela 5 não mostraram diferenças estatísticas significativas do volume tumoral entre o grupo controle e os tratados com jararagina 400 e 800 nM. As imagens obtidas do Rx estão ilustradas na figura 40.

Tabela 5 - Média \pm dp do volume do TEA dos grupos controle e tratados com jararagina nas concentrações de 400 e 800 nM.

Dias após inoculação do tumor	Volume do tumor (cm ³)		
	Controle	Jararagina 400 nM	Jararagina 800 nM
3	0,54 \pm 0,77	0,30 \pm 0,15	0,28 \pm 0,15
9	4,08 \pm 1,76	5,63 \pm 1,30	5,16 \pm 1,60
16	15,9 \pm 2,34	15,3 \pm 2,48	16,6 \pm 1,34

Os dados do volume do tumor foram calculados pela fórmula $C \times L^2/2$, onde os valores de comprimento (C) e largura (L) da cavidade abdominal foram obtidos pelo sistema de captura de imagem MS FX PRO. Os dados não apresentam diferenças significativas entre os grupos controle e tratados.

Figura 40 - Captura de imagem MS FX PRO representativas de camundongos BALB/c após 3, 9 e 16 dias do desenvolvimento do tumor de Ehrlich forma ascítica.

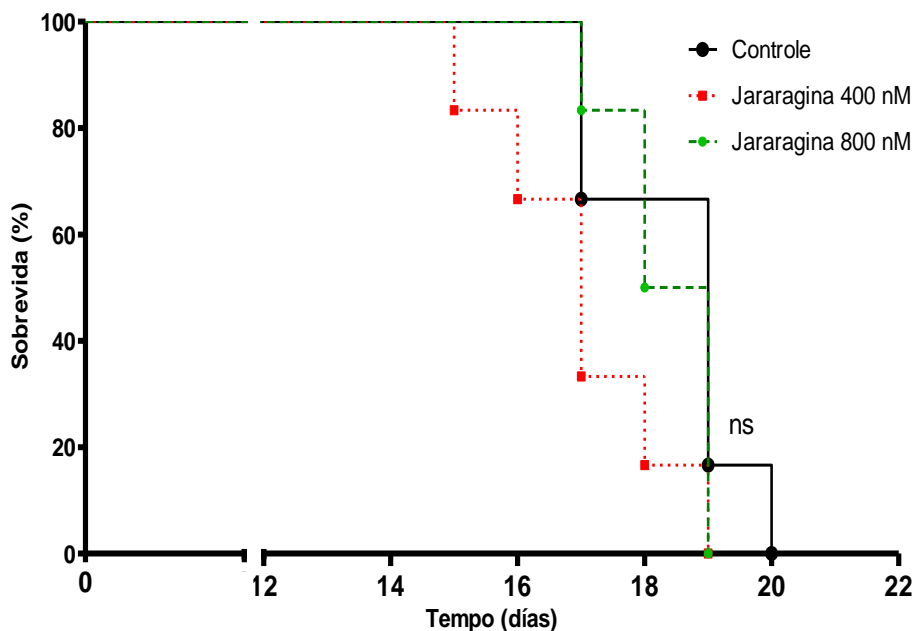


Os animais foram anestesiados, para captura da imagem ventral e lateral, e obtenção das dimensões de comprimento e largura da cavidade abdominal para o cálculo do volume tumoral.

3.3.1.2 Mortalidade dos camundongos BALB/c portadores do TEA tratados com jararagina

A taxa de sobrevivência dos camundongos com TEA foi avaliada no período de 20 dias e analisados pelo teste de probabilidade de sobrevivência de Kaplan-Meier, esta representada na figura 41. As análises não mostraram diferenças na taxa de sobrevivência entre os grupos de tratamento, com log-rank das curvas não significativo ($p = 0.6913$), sendo a média de sobrevivência de 17, 18,3 e 18,5 dias para os grupos tratados com jararagina 400, 800 nM e grupo controle, respectivamente.

Figura 41 - Curva de sobrevivência dos camundongos BALB/c portadores do TEA tratados com a jararagina nas concentrações de 400, 800 nM e grupo controle

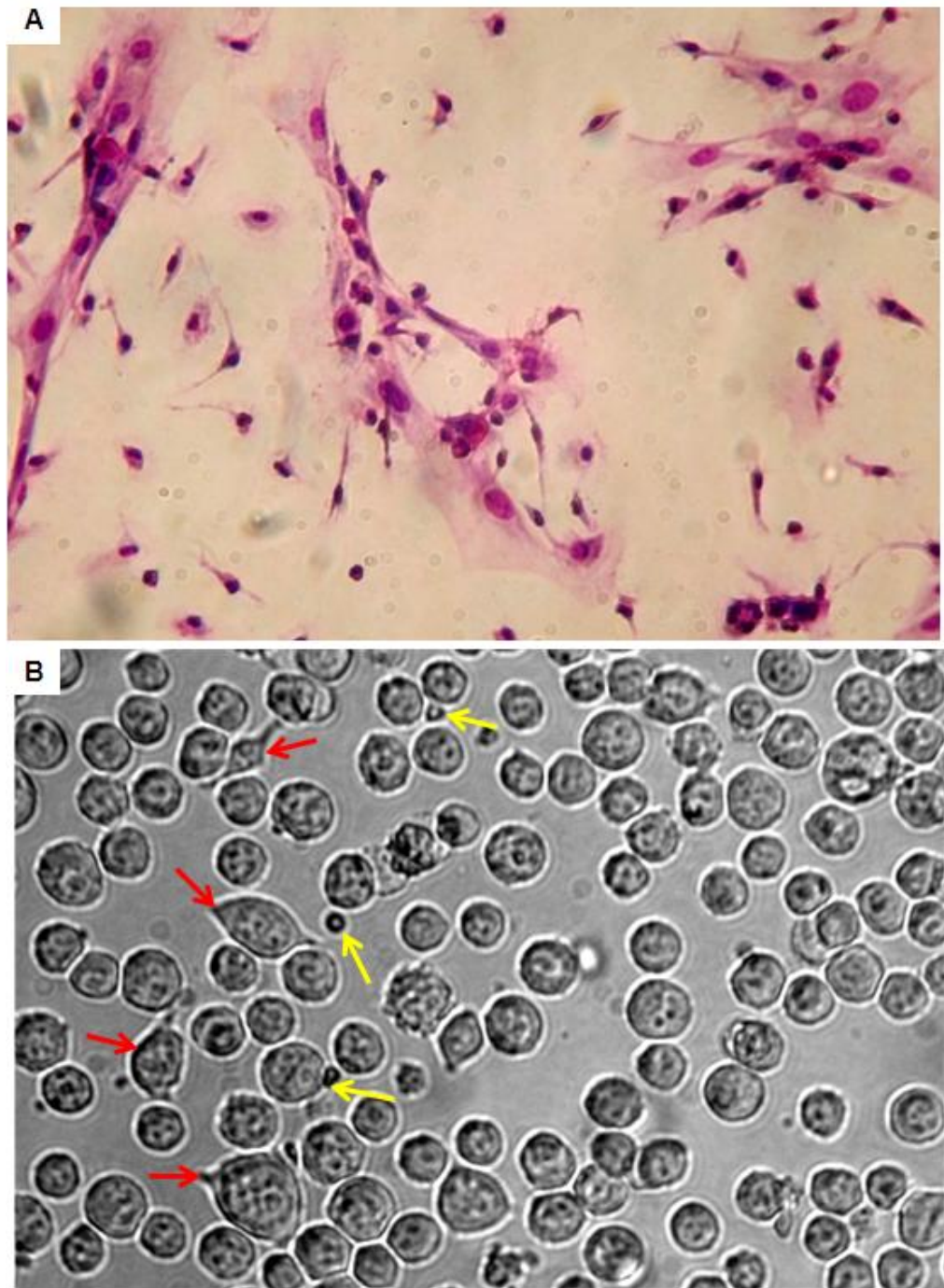


Taxa de sobrevivência de Kaplan-Meier com log-rank não significativo ($p = 0,6913$), ($n=6$).

3.3.1.3 Análise das populações celulares, fases do ciclo celular e marcadores por citometria de fluxo

As amostras coletadas das células tumorais contidas na cavidade peritoneal, após 7 e 14 dias do tratamento com a jararagina 400, 800 nM e grupo controle foram analisadas por citometria de fluxo para a quantificação da população tumoral e do infiltrado celular. A população celular presente na cavidade peritoneal dos camundongos com TEA foi comparada com a população de células residentes no peritônio de camundongos normais (sem tumor). As células residentes do peritônio, obtidas pela lavagem da cavidade abdominal de camundongos normais, incluem diversos tipos celulares (como macrófagos e fibroblastos), enquanto o tumor ascítico apresenta abundantes células tumorais não aderentes, conjuntamente com as células residentes. O aspecto citológico dos tipos celulares normais e de células tumorais presentes na cavidade peritoneal está ilustrado na figura 42A e 42B.

Figura 42 - Aspectos morfológicos das células aderentes do peritônio de camundongos da linhagem BALB/c normal (A) e portadores do TEA (B).

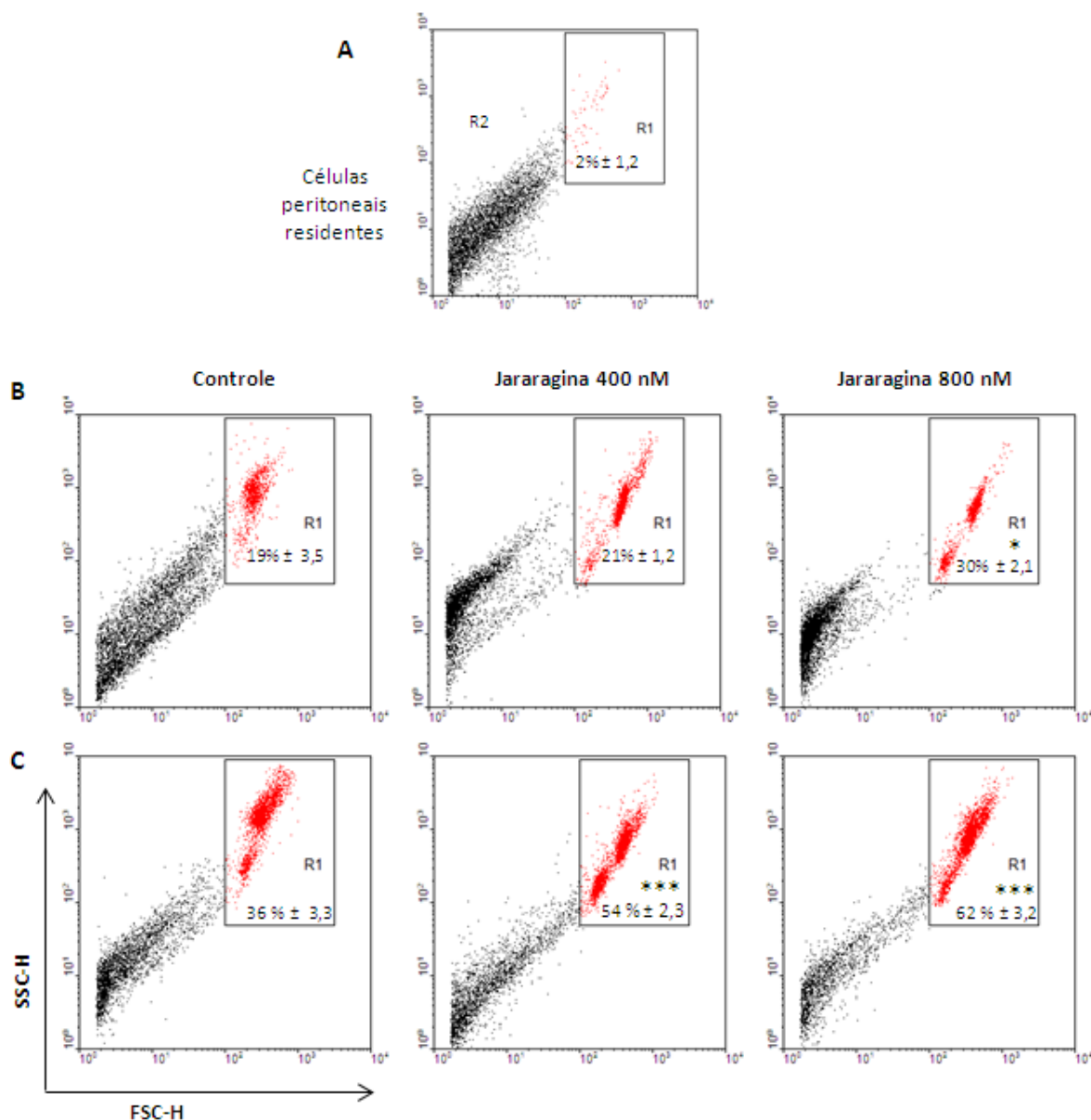


(A) Células residentes do peritônio de camundongo BALB/c normal obtidas pela lavagem com PBS e cultivadas a 37 °C por 4 horas para observação dos tipos celulares aderentes, após coloração com panótico. Aumento 100X. (B) Células do TEA, observa-se a presença de células tumorais, células fusiformes aderentes a placa de cultura (seta vermelha) e raras células inflamatórias (seta amarela). Aumento 200X.

A análise por citometria de fluxo e os gráficos do tipo *dot plots* representativos das populações celulares, após 7 e 14 dias de tratamento foram obtidos pelo programa WinMDI versão 2.9 (parâmetros X/Y: FSC (Volume)/SSC (Complexidade) e estão representados na figura 43. A comparação das populações celulares no fluido ascítico com a população celular residente do peritônio mostrou a presença de duas populações: uma população tumoral denominada R1 (maior volume celular), que aumenta progressivamente com o tempo do tumor, outra a população R2 correspondente às células residentes do peritônio.

As células residentes da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c normais, utilizadas como controle negativo, apresentaram em média $2,1\% \pm 1,2$ de células no quadrante R1 (Figura 43A). Após 7 dias de tratamento, no grupo tratado com a jararagina na concentração de 800 nM, ocorreu o aumento significativo da população R1 (** $p < 0,01$) em comparação ao grupo controle, sendo as médias de $30\% \pm 2,1$ e $19\% \pm 3,5$ respectivamente (Figura 43B). No 14º dia, ambas as concentrações de jararagina mostraram aumento significativo na população R1 em comparação ao controle, sendo as médias de $54\% \pm 2,3$ e $62\% \pm 3,2$ para os grupos tratados com jararagina 400 e 800 nM, respectivamente, e de $36\% \pm 3,3$ para o grupo controle (Figura 43C).

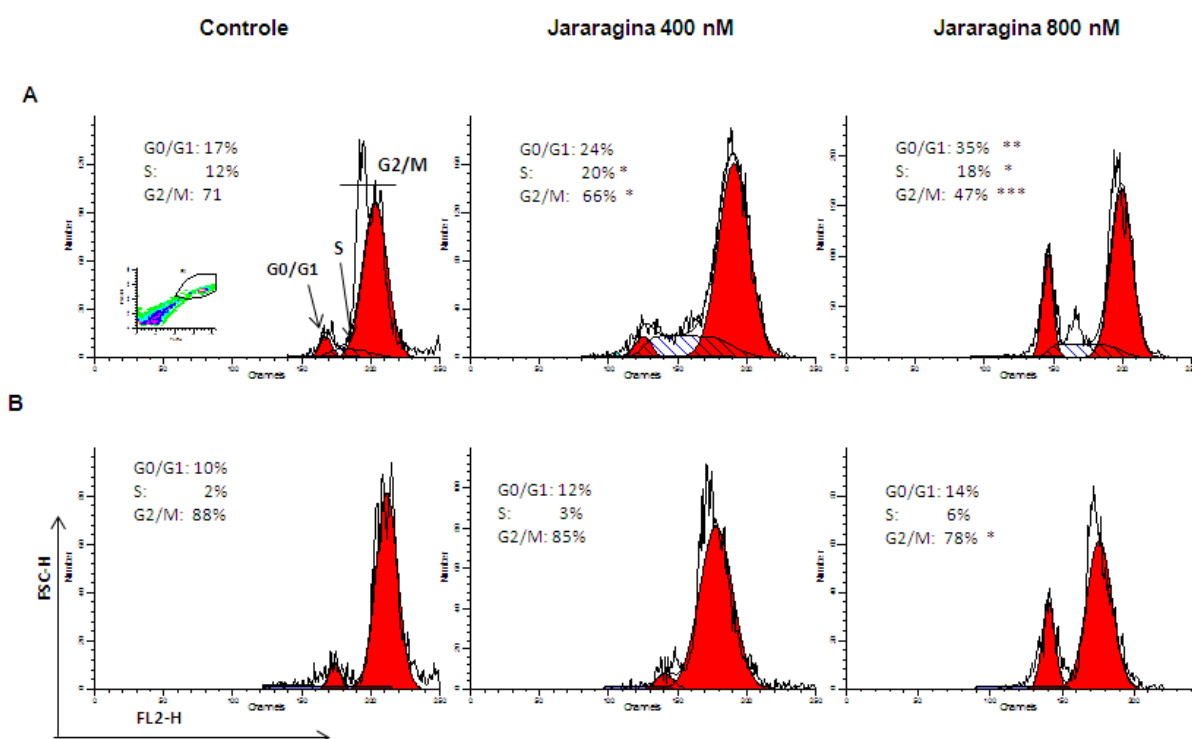
Figura 43 - Gráficos representativos do tipo *Dot plot* das células residentes peritoneais em camundongos BALB/c normais (A) e portadores do TEA, após 7 (B) e 14 (C) dias de tratamento com jararagina e grupo controle.



Distribuição das células peritoneais residentes de camundongos BALB/c normais (A) e portadores do TEA (B e C) tratados diariamente com jararagina nas concentrações de 400 e 800 nM e grupo controle. As coletas das células tumorais da cavidade peritoneal foram realizadas após 7 (B) e 14 (C) dias de tratamento e analisadas por citometria de fluxo, sendo identificadas no quadrante R1. O aumento da porcentagem da população de células tumorais no quadrante R1 foi significativo após 14 dias nos grupos tratados com 400 e 800 nM de jararagina, quando comparadas ao grupo controle. Valores expressos em média \pm dp e analisados pelo teste de Variância ANOVA de duas vias, seguido do teste de Bonferroni, * $p < 0,5$, *** $p < 0,001$.

A quantificação do DNA por citometria de fluxo da população R1 mostrou a distribuição das fases do ciclo celular após 7 (Figura 44A) e 14 dias (Figura 44B) de tratamento. O tratamento com a jararagina mostrou o aumento das fases G0/G1 e S no 7 e 14 dia após tratamento, em comparação ao controle. Houve diminuição da fase G2/M nos grupos tratados com jararagina, com proporção média de $71\% \pm 3,4$; $66\% \pm 2,7$ e $47\% \pm 3,5$, após 7 dias de tratamento, e $88,7\% \pm 3,7$, $84,2\% \pm 2,8$ e $78,2\% \pm 4,6$ após 14 dias, para os grupos controle e tratados com 400 e 800 nM de jararagina, respectivamente. As análises foram obtidas pelo programa MODFIT e estão apresentados na figura 44.

Figura 44 - Histogramas obtidos pelo programa MODFIT representativos das fases do ciclo celular na população R1 (*inset*) do TEA após 7 (A) e 14 (B) dias de tratamento.



As populações celulares presentes no fluido ascítico dos animais portadores do TEA, tratados com jararagina 400 e 800 nM apresentam diminuição significativa da fase G2/M e aumento significativo de células em sub-G1, quando comparadas ao grupo controle, após 7 e 14 dias de experimentação. Análise de Variância de ANOVA de duas vias, seguido do teste de Bonferroni, * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

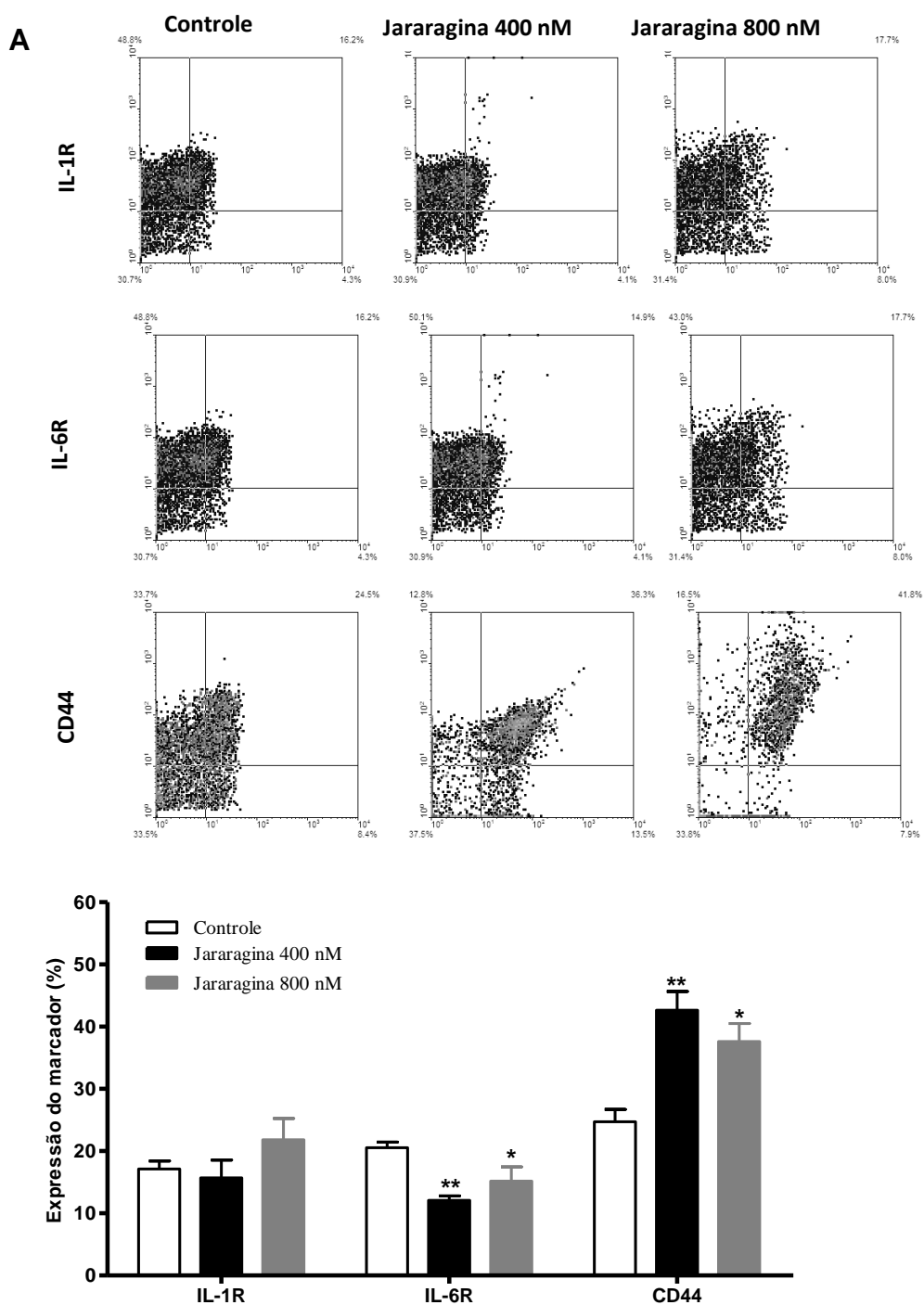
3.3.1.4 Análise dos marcadores/receptores de membrana e nucleares por citometria de fluxo

Após a coleta das células tumorais dos animais portadores de TEA no 14º dia de tratamento foram realizadas as análises dos marcadores por citometria de fluxo, sendo comparada a porcentagem da expressão dos marcadores nos grupos de tratamento com jararagina em relação ao controle. Os dados foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSCalibur e analisados pelo programa *WinMDI versão 2.9*, e estão apresentados em gráfico de barras das médias \pm desvio padrão.

a. Marcadores de inflamação

A expressão do receptor de IL-1 não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos com jararagina e o grupo controle, enquanto a diminuição do receptor de IL6 e aumento do marcador CD44 nas células tumorais do fluido ascítico dos camundongos tratados com jararagina 400 e 800 nM mostraram significativa diminuição quando comparados ao grupo controle. Os histogramas representativos estão apresentados na figura 45A, e as médias \pm dp da expressão dos marcadores em cada grupo experimental estão apresentados no gráfico da figura 45B.

Figura 45 - Expressão dos receptores pró-inflamatórios IL-1R, IL-6R e CD44 em células do TEA de camundongos BALB/c, tratados com jararagina e grupo controle.

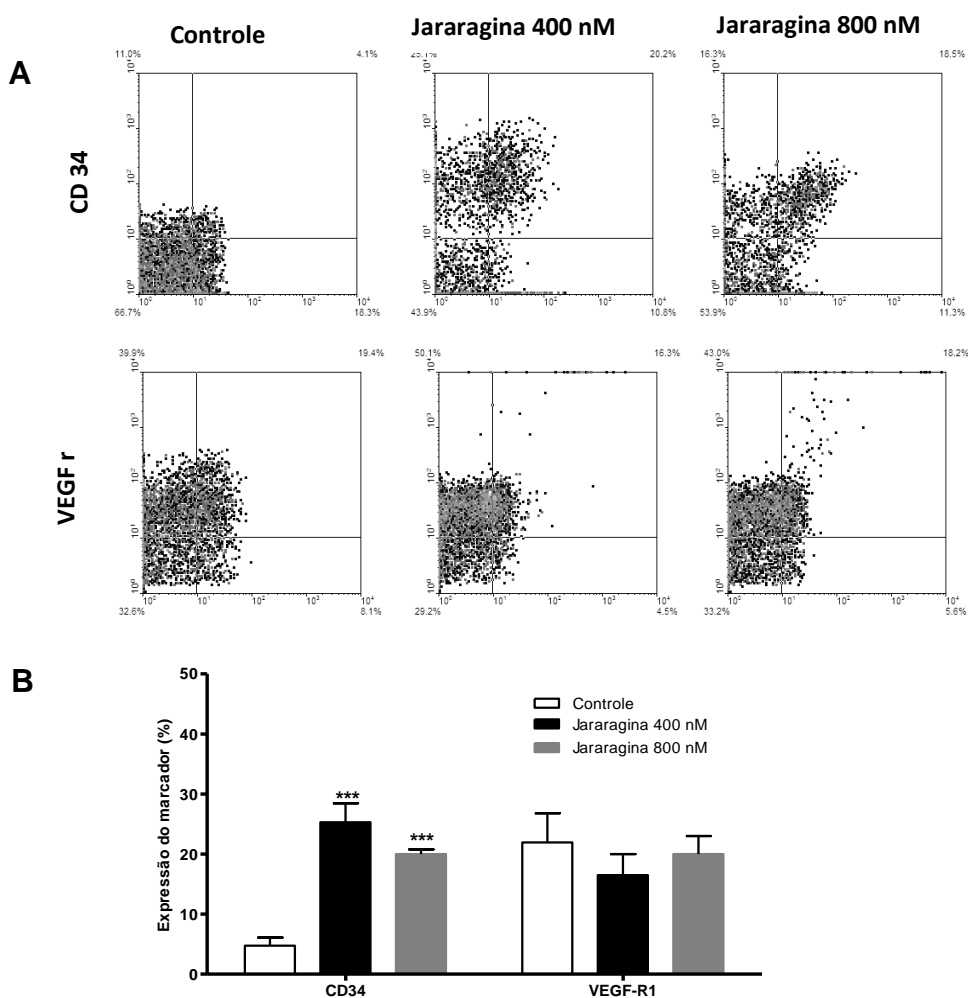


(A) Gráficos *Dot plot* representativos da expressão de IL1R, IL-6R e CD44 em células do TEA, após 14 dias de tratamento. (B) Gráfico de barras representando a porcentagem média \pm dp da expressão do marcador, analisados pelo teste de Variância de ANOVA, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

b. Marcadores de migração e angiogênese

Foram analisadas as expressões dos marcadores CD34 e VEGF-R1. O CD34 é uma proteína transmembrana que funciona como um fator de adesão celular e de células endoteliais, e VEGFR1 é um fator de crescimento e angiogênese. A expressão do marcador CD34 aumentou significativamente nos grupos tratados com jararagina 400 e 800 nM em relação ao controle, enquanto não houve diferenças significativas na expressão do VEGF-R1 (Figura 46).

Figura 46 - Expressão dos marcadores CD34 e VEGF-R1 em células do TEA em camundongos BALB/c, tratados e grupo controle.

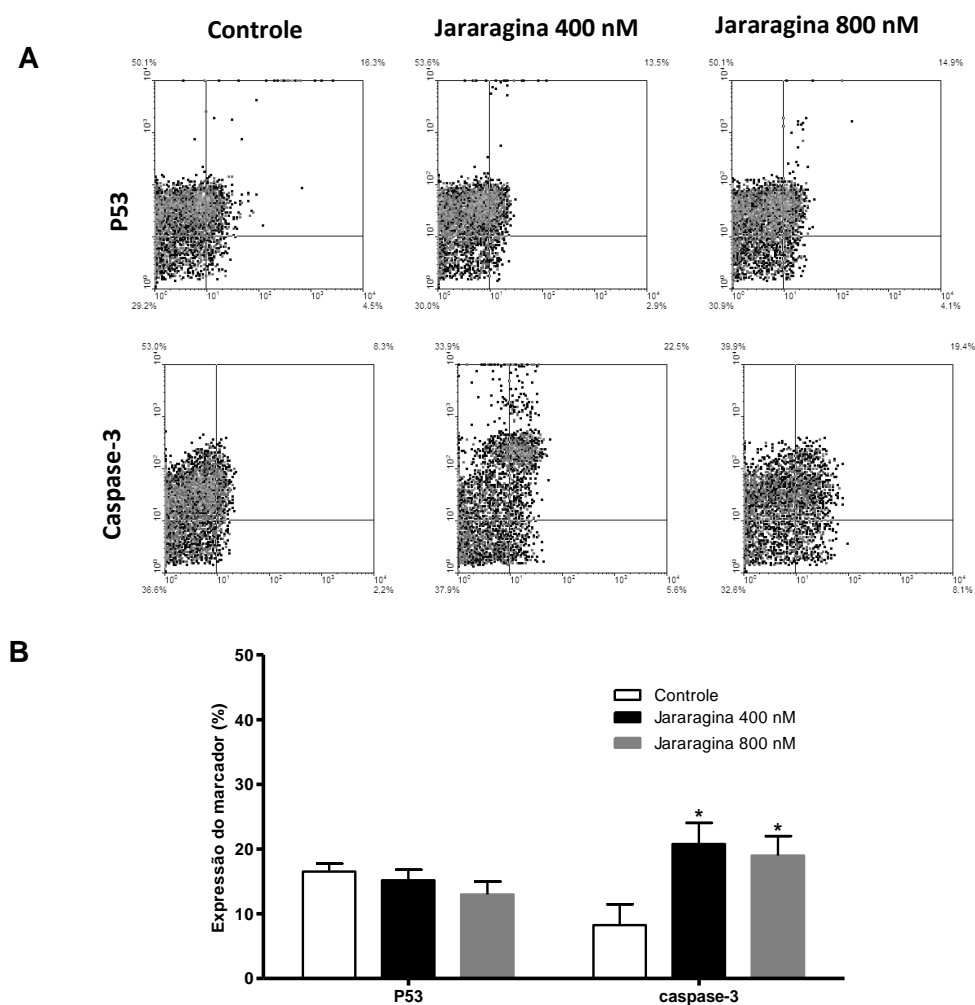


(A) Gráficos *Dot plot* representativos da expressão dos marcadores CD34 e VEGF-R1 em células do TEA, após 14 dias de tratamento (B). Gráfico de barras representando a porcentagem média \pm dp da expressão dos marcadores e analisados pelo teste de Variância de ANOVA de uma via, *** $p < 0,001$.

c. Marcador de checagem e progressão do ciclo celular

A análise das células do TEA mostrou que os grupos tratados com jararagina não apresentaram diferenças significativas na expressão da p53, quando comparados ao grupo controle. Por sua vez, os tratamentos com jararagina 400 e 800 nM induziram aumento significativo na expressão do marcador caspase-3 clivada, em comparação ao grupo controle. Os histogramas representativos estão apresentados na figura 47 A e as médias \pm dp dos diferentes grupos de tratamento na figura 47 B.

Figura 47 - Expressão da proteína p53 e caspase-3 clivada em células do TEA em camundongos BALB/c tratados com jararagina e grupo controle.

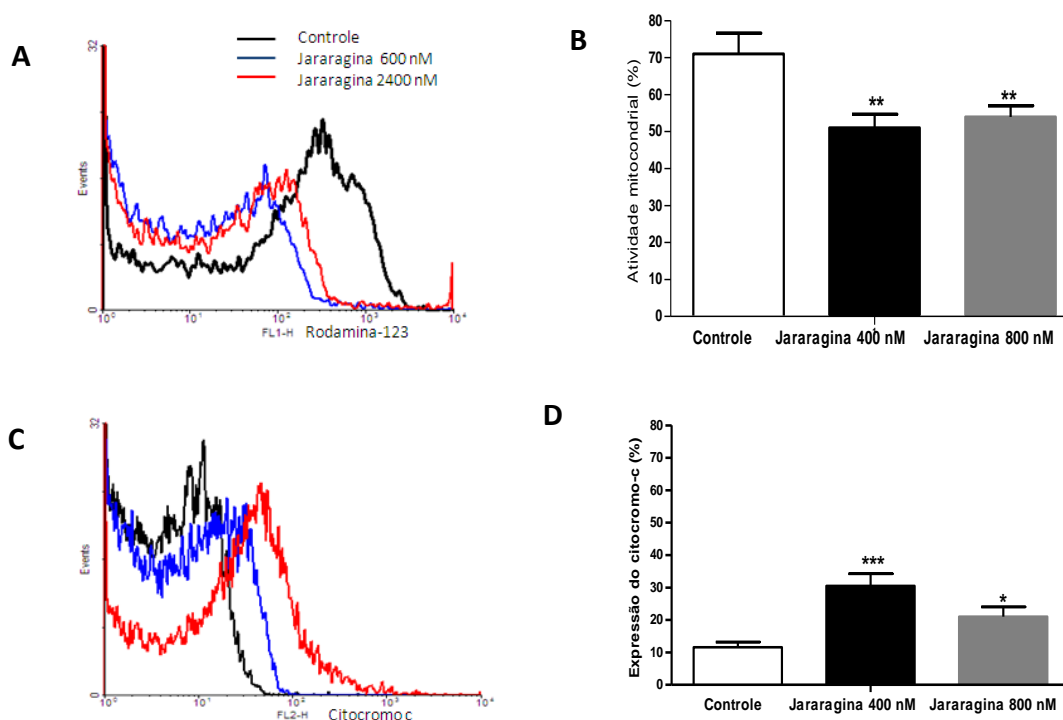


(A) Gráficos *Dot plot* representativos da expressão do marcador P53 e caspase-3 em células do TEA, após 14 dias de tratamento (B). Gráfico de barras representando a porcentagem média \pm dp da expressão dos marcadores e analisados pelo teste de Variância de ANOVA de uma via, * $p < 0,05$.

d. Potencial elétrico da membrana mitocondrial e liberação do citocromo-c

O Potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) é fundamental para manter a função fisiológica da cadeia respiratória para gerar energia (ATP). A perda significativa do $\Delta\Psi_m$ diminui a produção de energia, com posterior morte celular. As análises realizadas em citômetro de fluxo após marcação pela sonda fluorescente Rodamina-123 mostraram que o tratamento com jararagina nas concentrações de 400 e 800 nM diminuíram significativamente o potencial elétrico mitocondrial em comparação ao grupo controle, como mostrado na figura 48A e B. Este evento da atividade mitocondrial foi acompanhado pela liberação do citocromo-c, que é uma proteína da cadeia transportadora de elétrons que reside no espaço intermembrana da mitocôndria. Após exposição do TEA ao tratamento com jararagina 400 e 800 nM a expressão de citocromo-c aumentou significativamente em comparação ao grupo controle (Figura 48C e D).

Figura 48 - Expressão do potencial elétrico mitocondrial e citocromo-c nas células do TEA grupos controle e tratados com jararagina.

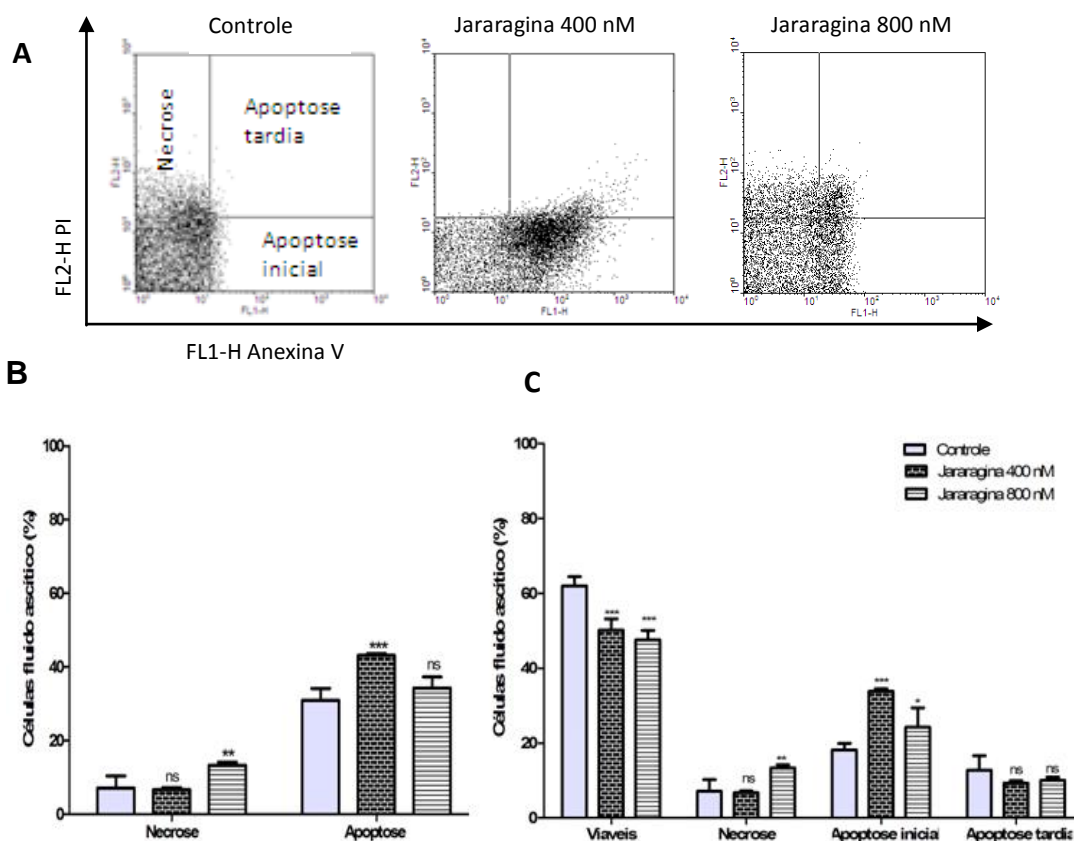


Histograma *overlay* representativo do potencial elétrico da membrana mitocondrial (A) e liberação do citocromo-c (C) em células do TEA. Gráfico de barras representativo da porcentagem média \pm dp da atividade mitocondrial (B) e expressão do citocromo c (D), após 14 dias de tratamento. Diferenças estatísticas obtidas pelo teste de Variância de ANOVA * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

e. Marcadores de Morte Celular Anexina-V (Apoptose)/ PI (Necrose)

A análise da porcentagem de células de TEA mortas por apoptose (Anexina V) ou necrose (PI) foi realizada por citometria de fluxo. O tratamento com jararagina 400 nM induz aumento significativo da morte por apoptose ($***p < 0,001$), enquanto que o tratamento com jararagina 800 nM mostrou que além da apoptose há um aumento significativo da morte por necrose ($**p < 0,01$), quando comparados ao controle (Figura 49A). Na morte por apoptose, observou-se que o tratamento com jararagina 400 e 800 nM induz aumento significativo da apoptose inicial em comparação ao controle (Figura 49B).

Figura 49 - Expressão das vias de morte celular determinadas pela marcação com Anexina V/PI em células do TEA em camundongos BAL/c tratados com a jararagina e grupo controle.



(A) Gráficos do tipo *Dot plot* representativos da porcentagem de células mortas por necrose ou apoptose em células do TEA. (B) Gráficos de barras representando a porcentagem média \pm dp das células mortas por apoptose, necrose e células viáveis analisados pelo teste de Variância de ANOVA, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns: não significativa.

3.3.1.5 Análise do perfil hematológico

O perfil hematológico dos camundongos BALB/c portadores de TEA mostrou aumento significativo no número de leucócitos totais e plaquetas, após o 14º dia de tratamento quando comparado ao 7º dia após implantação das células tumorais. O número de eritrócitos não apresentou diferenças entre as coletas realizadas. Os dados das médias \pm dp dos diferentes grupos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Número de leucócitos ($10^6/\text{ml}$), eritrócitos ($10^9/\text{ml}$) e plaquetas ($10^6/\text{ml}$) de camundongos BALB/c portadores do TEA, após 7 e 14 dias de tratamento com jararagina e grupo controle.

Células	Tempo (dias)	Controle	Jararagina 400nM	Jararagina 800nM
Leucócitos	7	6,7 \pm 2,1	7,1 \pm 1,7	7,3 \pm 1,4
	14	13,4 \pm 4,0	12,1 \pm 5,9	15,8 \pm 2,2
Eritrócitos	7	12,8 \pm 2,4	10,8 \pm 1,9	13,4 \pm 2,3
	14	14,2 \pm 1,8	17,7 \pm 3,5	13,1 \pm 1,9
Plaquetas	7	303 \pm 69,4	279,2 \pm 52,1	233,6 \pm 48,9
	14	484 \pm 64,1	534,5 \pm 318,9	418,6 \pm 194,9

Valores expressos em média \pm dp, analisados pelo teste de Variância de ANOVA de duas vias, * $p < 0,05$. Diferenças estatísticas entre as coletas de leucócitos e plaquetas realizadas após 7 e 14 dias de tratamento.

A contagem diferencial mostrou neutrofilia nos grupos tratados com jararagina em relação ao grupo controle, com agrupamentos de neutrófilos na extensão da lâmina. A linfocitose dos grupos de animais com TEA tratados com jararagina em ambas as concentrações foi observada nos períodos de 7 e 14 dias de experimentação (Tabela 7).

Tabela 7 - Contagem diferencial de leucócitos em camundongos BALB/c portadores do TEA, após 7 ou 14 dias de tratamento com jararagina e grupo controle.

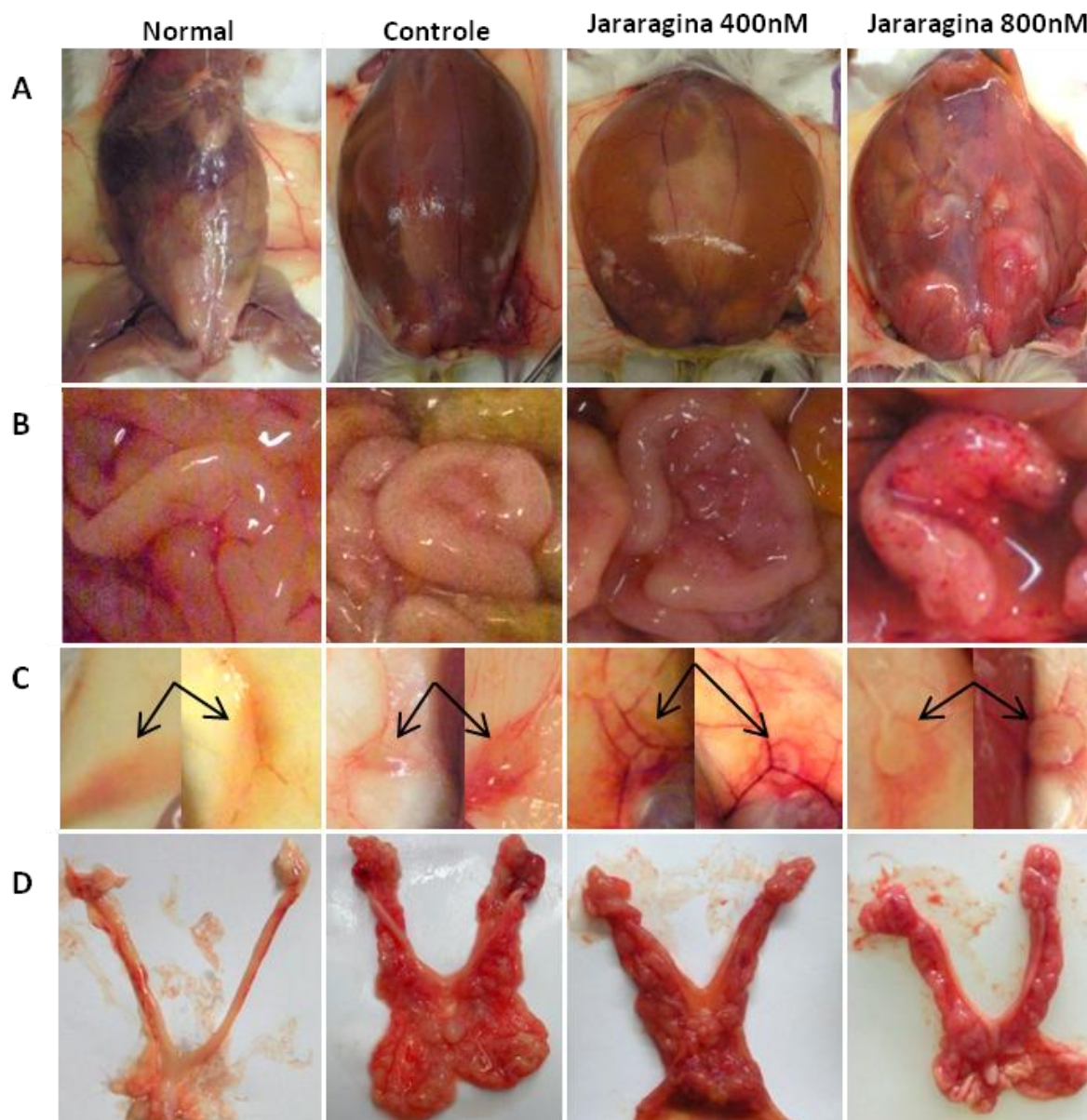
Grupos	Tempo (dias)	Linfócitos (10⁶/mL)	Neutrófilos (10⁶/mL)	Eosinófilos (10⁶/mL)	Monócitos (10⁶/mL)
Controle	7	4,3 ± 2,2	1,1 ± 0,6	0,5 ± 0,2	0,1 ± 0,02
	14	7,6 ± 4,1	1,6 ± 0,9	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,16
Jararagina 400 nM	7	5,1 ± 2,6	1,7 ± 0,8	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,13
	14	6,8 ± 0,9	3,2 ± 1,1	0	0
Jararagina 800 nM	7	4,8 ± 2,6	1,5 ± 0,9	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,05
	14	9,7 ± 2,9	3,1 ± 1,6	0,6 ± 0,8	0,6 ± 0,33

Valores expressos em média ± dp. Diferenças significativas comparadas ao controle, obtidas após análise pelo teste de Variância de ANOVA de uma via.

3.3.1.6 Análise das alterações em órgãos internos após necropsia dos animais portadores do TEA

Durante o processo de necropsia foram avaliados os seguintes parâmetros: volume tumoral, caquexia e alterações comportamentais como motricidade e piloereção, além de injúria causada pela administração da toxina na cavidade peritoneal. O aumento no volume abdominal foi observado em todos os grupos de animais portadores do TEA (figura 50A). A figura ilustra o aspecto macroscópico da ascíte desenvolvida na cavidade abdominal dos animais dos grupos controle e tratados com jararagina 400 e 800 nM, comparando-as com o volume abdominal no camundongo normal. Após a coleta do volume da ascite, foi observado a formação de pontos de hemorragia no epitélio intestinal dos animais tratados com jararagina na concentração de 800 nM (Figura 50B). Os linfonodos foram localizados e mostraram aumento de diâmetro em até 3 mm nos animais tratados com jararagina em ambas concentrações, quando comparados ao do grupo controle (Figura 50C). Os cornos uterinos de todos os grupos com TEA apresentaram-se aumentados em sua espessura, possivelmente por ser um sítio de formação de massas tumorais metastáticas (Figura 50D).

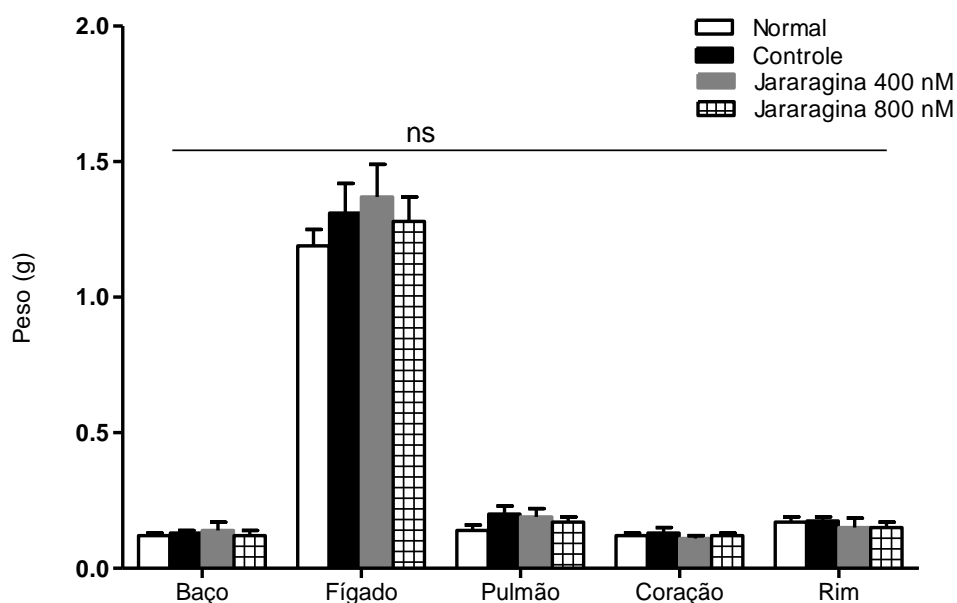
Figura 50 - Fotografias dos aspectos macroscópicos da necropsia em camundongos BALB/c portadores de TAE e camundongo normal-referência.



(A) Fotografia representativa da cavidade abdominal dos diferentes grupos de experimentação; (B) Cavidade abdominal mostrando o aspecto macroscópico dos intestinos e lesão hemorrágica no grupo tratado com jararagina 800 nM, (C) Linfonodos inguinais mostrando maior diâmetro nos grupos tratados com a jararagina, (D) Cornos uterinos e órgão reprodutor feminino, observa-se metástase em todos os grupos portadores do TEA.

A coleta e avaliação do peso dos órgãos internos: baço, fígado, pulmão, coração e rim, não mostraram diferenças significativas entre os grupos de tratamento com jararagina e grupo controle, como também nenhuma alteração macroscópica digna de nota foi observada (Figura 51).

Figura 51 - Gráfico de barras representando a média \pm dp do peso dos órgãos internos dos camundongos BALB/c tratados com jararagina, grupo controle e normal.



Os órgãos internos dos grupos tratados com jararagina não apresentam diferenças significativas com o grupo controle. Dados analisados pelo teste de Variância de ANOVA de uma via, e comparação múltipla de Tukey, ns = não significativo.

3.3.1.7 Análise do fluido ascítico

O líquido ascítico coletado durante a necropsia mostrou diferentes graus de hemorragia, com variações no volume, conteúdo e celularidade. O volume total do tumor ascítico e suas frações (botões celulares e sobrenadantes) não mostraram diferenças significativas entre os grupos de animais tratados com jararagina e o grupo controle. A análise citológica do fluido ascítico, após tratamento com jararagina e grupo controle, mostrou a presença de células tumorais, leucócitos e eritrócitos. A média do número de células tumorais e leucócitos presentes no líquido ascítico não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Entretanto, a avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de tripan mostrou diminuição significativa nas células dos grupos tratados com jararagina, sendo em

média de 51%, 38%, e 29% para os grupo controle e jararagina 400 e 800 nM, respectivamente.

A determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no sobrenadante da ascite, calculado pela lipoperoxidação, também apresentou aumento significativo nos grupos tratados com a jararagina em ambas as concentrações em comparação ao controle, entretanto, não houve diferenças significativas na concentração de proteínas totais do fluido ascítico entre os grupos. O número de eritrócitos totais apresentou aumento significativo no grupo tratado com jararagina 800 nM em comparação ao grupo controle. Os dados estão apresentados na Tabela 8.

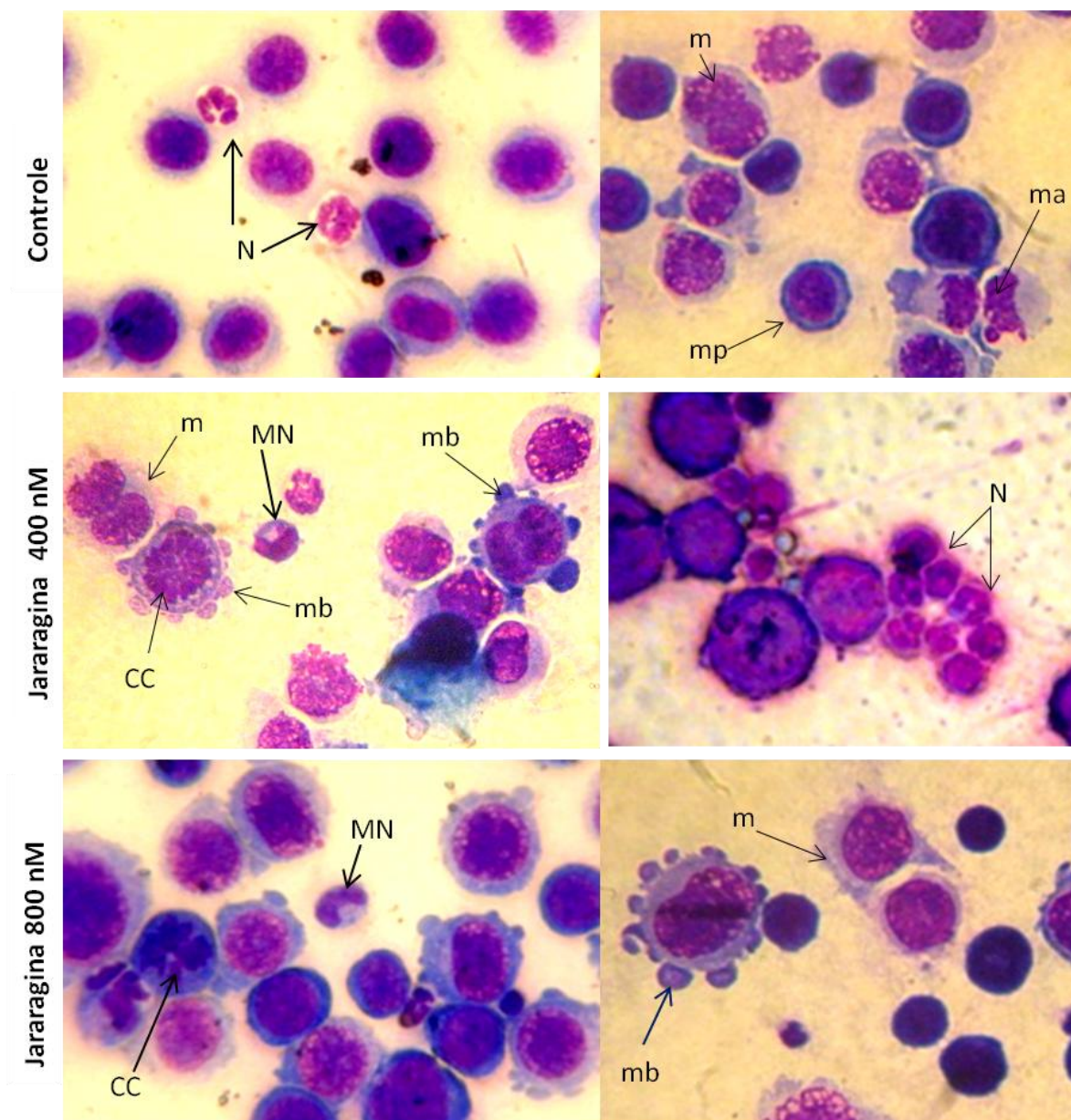
Tabela 8 - Avaliação do fluido ascítico de camundongos BALB/c portadores de TAE dos grupos controle e tratado com jararagina 400 e 800 nM.

Células	Controle	Jararagina 400nM	Jararagina 800nM
Volume ascite (mL)	15,7 ± 3,5	14,8 ± 2,3	14,7 ± 2,6
Células tumorais (10 ⁶ /mL)	92,5 ± 31,6	75,3 ± 29,5	86,6 ± 26,8
Viabilidade celular (%)	51,9 ± 16,1	38,9 ± 15 (*)	29,1 ± 18,5 (**)
Eritrócitos (10 ⁶ /mL)	15,5 ± 2,1	25,3 ± 5,4	52,3 ± 5,5 (***)
Leucócitos (10 ⁶ /mL)	14,5 ± 11,4	25,2 ± 10,1	20,1 ± 8,3
Vol do botão celular	4,8 ± 1,3	3,3 ± 1,7	4,3 ± 1,8
Volume do sobrenadante (mL)	10,8 ± 4,5	8,9 ± 3,8	10,6 ± 3,1
Proteínas totais (mg/mL)	201,7 ± 15	202,1 ± 13,5	181,3 ± 16,7
MDA (nM/mL)	72,1 ± 5,2	269 ± 18,1(***)	160 ± 16,2 (**)

Valores expressos em média ± dp, analisados pelo teste de Variância de ANOVA de uma via, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Os esfregaços das células do tumor ascítico mostraram células neoplásicas e a presença de infiltrado inflamatório, constituído predominantemente por linfócitos e neutrófilos, e em menor número por eosinófilos. A intensidade da inflamação variou de discreta a moderada, com maior intensidade nos grupos tratados com jararagina 800 nM (Figura 52). As células tumorais apresentaram-se pleomórficas e grandes, com pouco citoplasma e núcleos volumosos. As células do grupo controle apresentaram-se fracamente basofílicas, em sua maioria com bordas definidas. As células dos grupos tratados com jararagina apresentaram-se heterogêneas com basofília e bordas pouco definidas. O índice mitótico foi maior no grupo tratado com jararagina 400 e 800 nM, sendo encontrados várias figuras de mitose normais e atípicas.

Figura 52 - Aspecto citológico do TEA após tratamento com jararagina nas concentrações de 400 e 800 nM e grupo controle.



As células dos animais portadores do TEA grupo controle mostram núcleo com cromatina dispersa, membrana plasmática organizada, e células inflamatórias tipo neutrófilo (n), e células em mitose (m) com figuras de mitoses atípica (ma). TEA tratado com jararagina 400 e 800 nM, apresentam *blebbing* na membrana citoplasmática (mb), cromatina condensada (CC), e células inflamatórias como neutrófilos (N) e monócitos (MN). Também foram observada predominância de células com fraca basofilia no citoplasma das células tumorais do grupo controle, enquanto que no grupo tratado com jararagina há um predomínio de células eosinofílicas (Aumento 400X).

3.3.2 Modelo experimental do tumor de Ehrlich sólido - ortotópico (TES)

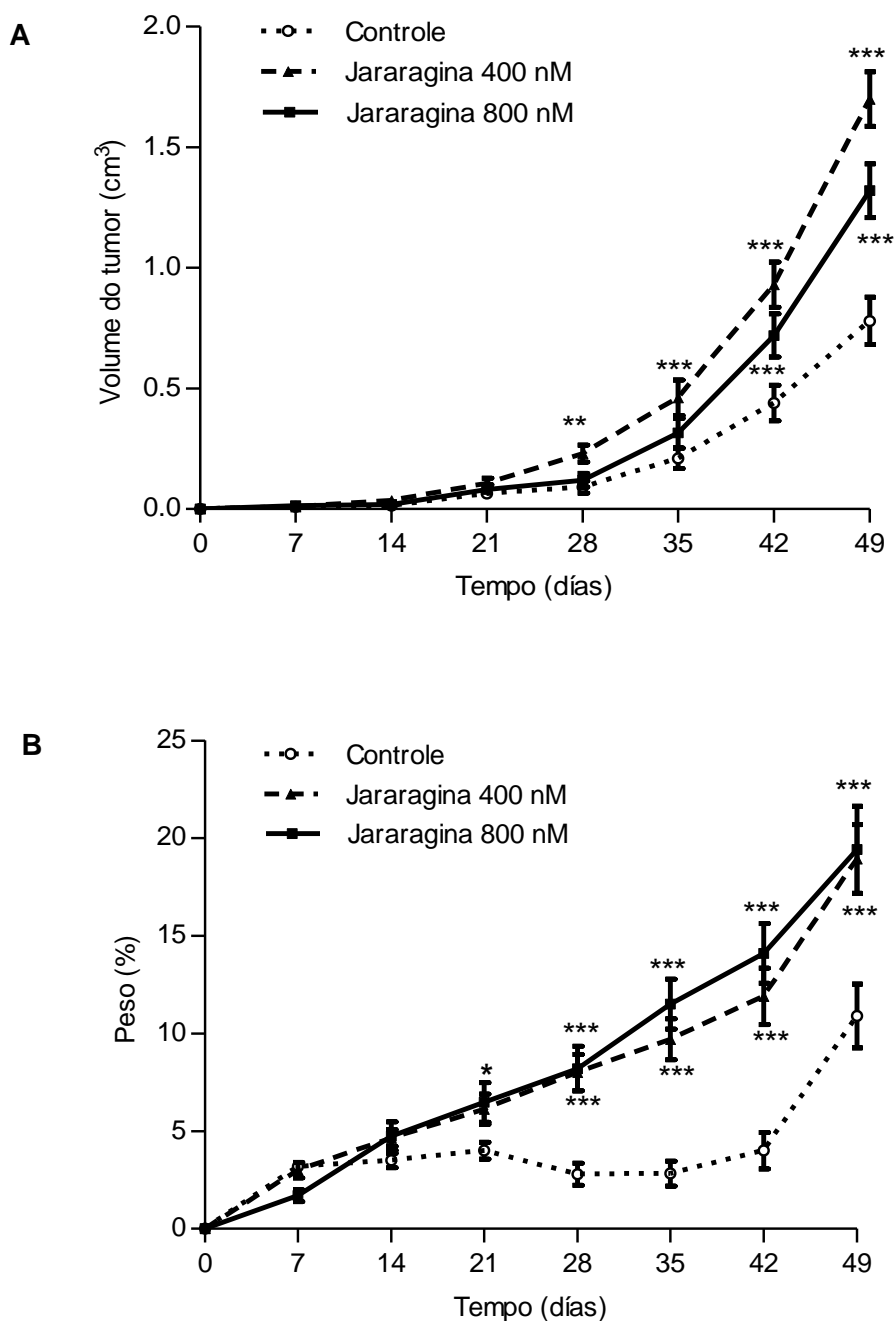
3.3.2.1 Determinação do volume tumoral e peso corpóreo

A presença de células tumorais no sangue e o volume significativo do tumor nos grupos tratados foram parâmetros pelo qual o experimento foi finalizado após 49 dias de tratamento.

Os camundongos dos grupos tratados com jararagina em ambas as concentrações mostraram maior crescimento tumoral em comparação ao grupo controle, sendo significativo a partir do 28° e 42° dia de tratamento. Após o 49° dia de inoculação do tumor, as médias finais do volume tumoral foram 0,78 cm³ para o grupo controle, 1,8 cm³ e 1,32 cm³ para os grupos jararagina 400 e 800 nM, respectivamente (Figura 53A). Utilizando-se como referência o grupo controle, o tratamento com jararagina 400 nM e 800 nM induziu aumento do volume do tumor em 2,3 e 1,6 vezes, respectivamente.

A avaliação do peso dos animais portadores do TES mostrou que os animais dos grupos tratados com a jararagina 400 e 800 nM ganharam peso ao longo do experimento, sendo significativos a partir do 28° dia, com ganho do peso de 21,9% ± 1,6 e 22,4% ± 1,9 em relação a seu peso inicial após 49 dias de tratamento. Em contraste, os camundongos do grupo controle ganharam em média 4% ± 0,6 do peso inicial após 42 dias de tratamento, tendo a aumento progressivo de em média de 10,9% ± 1,2 até o final da experimentação (Figura 53B).

Figura 53 - Efeito do tratamento com jararagina no crescimento do tumor e peso dos camundongos BALB/c portadores do TES durante 49 dias de tratamento.



(A) Curva de crescimento do TES (B) Curva de aumento do peso corpóreo. Valores expressos em média \pm dp e diferenças estatísticas obtidas pelo teste de Variância de ANOVA de duas vias, e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

3.3.2.2 Perfil hematológico dos camundongos BALB/c portadores do TES

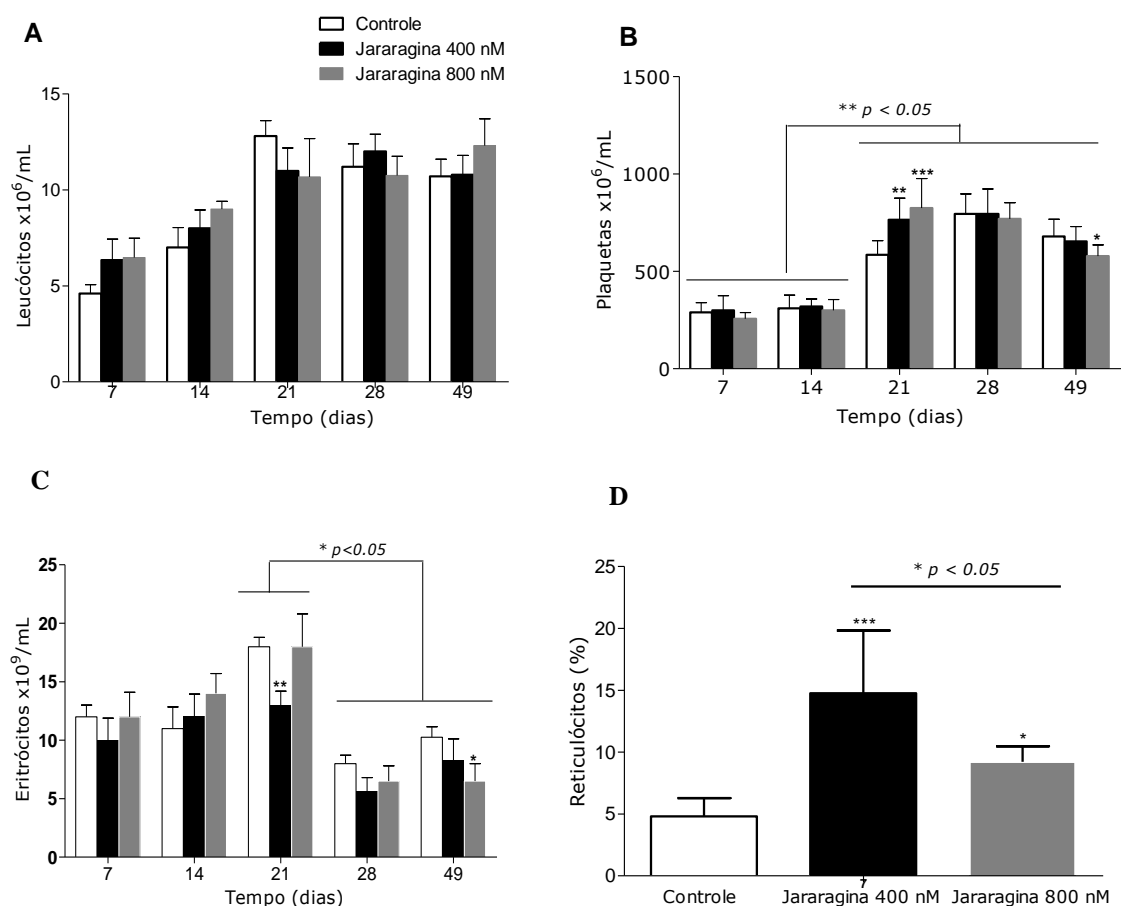
A avaliação do perfil hematológico dos camundongos portadores do TES foi realizada após 5 coletas de amostras de sangue periférico. Os valores da contagem e as diferenças entre os grupos se encontram resumidos na Tabela 10. O número de leucócitos totais e plaquetas apresentaram aumento significativo em todos os grupos de tratamento a partir do 21º dia, induzindo leucocitose sem diferenças entre os grupos de tratamento com jararagina (Figura 54A). Na contagem de plaquetas foi observado aumento significativo nos grupos tratados com a jararagina no 21º dia, sendo observado plaquetose, que foi diminuindo gradualmente durante o tratamento em todos os grupos (Figura 54B). O número de eritrócitos apresentou diminuição significativa durante as coletas realizadas nos 28º e 49º dias de tratamento com jararagina (Figura 54C), com a presença de anemia em todos os grupos. A existência de anemia foi confirmada pela quantificação do número de reticulócitos no 49º dia de experimentação, observando-se aumento significativo de reticulócitos com desvio a esquerda, como resposta ao tratamento com a jararagina (Figura 54D).

Tabela 9 - Número de leucócitos totais, eritrócitos e plaquetas de camundongos BALB/c portadores do TES, após 7, 14, 21, 28, e 49 dias de tratamento.

Células	Tempo (dias)	Controle	Jararagina 400 nM	Jararagina 800 nM
Leucócitos ($10^6/\text{mL}$)	7	4,6 ± 0,4	6,3 ± 1,1	6,5 ± 1,0
	14	7,1 ± 1,1	8,0 ± 0,9	9,6 ± 0,4
	21	12,8 ± 0,8	10,9 ± 1,2	10,7 ± 2,0
	28	11,2 ± 1,2	12,1 ± 0,9	10,8 ± 1,1
	49	10,7 ± 0,9	10,8 ± 1,0	12,3 ± 1,4
Eritrócitos ($10^9/\text{mL}$)	7	12,3 ± 1,1	10,8 ± 1,9	12,4 ± 2,1
	14	11,7 ± 1,8	12,5 ± 1,9	14,1 ± 1,7
	21	18,2 ± 0,8	13,6 ± 1,2 (**)	18,3 ± 2,8
	28	8,1 ± 0,7	5,6 ± 1,0	6,5 ± 1,3
	49	10,2 ± 1,4	8,25 ± 1,8	6,5 ± 1,5 (*)
Plaquetas ($10^6/\text{mL}$)	7	290 ± 49	300 ± 75	257 ± 32
	14	310 ± 68	320 ± 38	300 ± 55
	21	585 ± 73	765 ± 91 (**)	825 ± 152 (***)
	28	795 ± 93	765 ± 128	770 ± 83
	49	679 ± 89	654 ± 76	579 ± 57 (*)

Valores expressos em média \pm dp, e diferenças estatísticas analisados pelo teste de Variância ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni, diferenças estatísticas representados por * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$).

Figura 54 - Perfil hematológico dos camundongos BALB/c com TES tratados com jararagina 400, 800 nM e grupo controle.

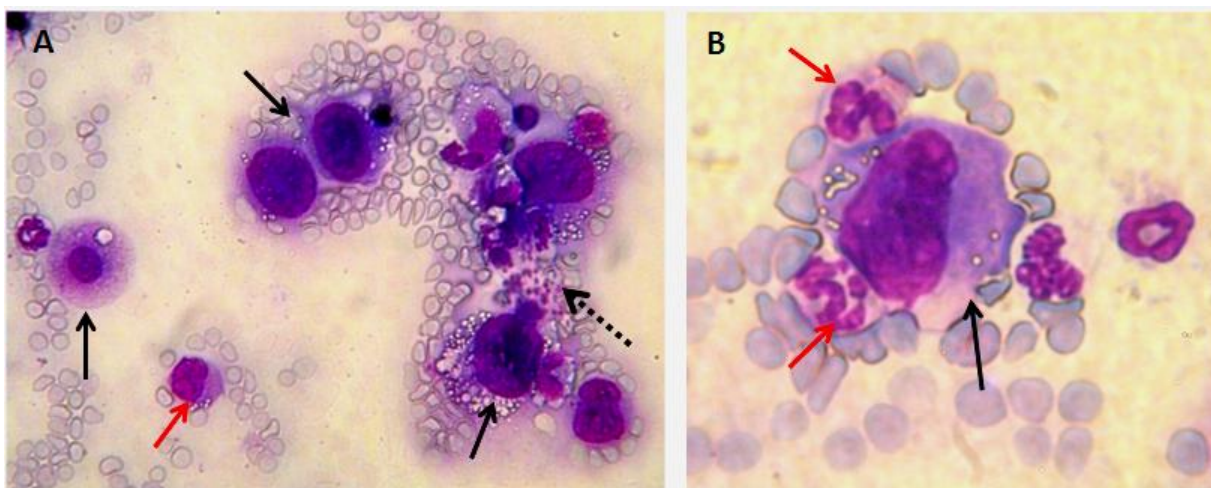


Número de leucócitos totais (A), plaquetas (B) e eritrócitos (C) do sangue periférico de camundongos BALB/c portadores o TES, durante 49 dias de tratamento. Porcentagem média de reticulócitos (D) no final do tratamento. Valores expressos em média \pm dp e diferenças estatísticas obtidas pelo teste de Variância de ANOVA de duas vias (A, B, C) ou uma via (D), e pós-teste de Bonferroni (* $p < 0.05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

A contagem diferencial mostrou que as células predominantes foram leucócitos polimorfonucleares (PMN), principalmente neutrófilos, enquanto a população de leucócitos mononucleares (MN) permaneceu praticamente inalterada em cada grupo de tratamento.

Outro aspecto importante observado durante a contagem das células sanguíneas foi a presença de células tumorais na corrente circulatória do grupo de animais tratados com jararagina 400 nM na coleta de sangue realizada no 49º dia. Nos esfregaços sanguíneos mostrados na figura 55, há presença de células tumorais com núcleo grandes e vacúolos no citoplasma, neutrófilos e agregação plaquetária são visualizados. No grupo controle não foram observadas células tumorais na contagem celular nem nos esfregaços sanguíneos.

Figura 55 - Fotomicrografia do esfregaço sanguíneo mostrando células tumorais no 49º dia de tratamento de camundongos BALB/c portadores do TES e tratados com jararagina 400 nM.



Notar células tumorais exibindo basofilia nuclear e a presença de vacúolos citoplasmáticos (seta preta); infiltrado inflamatório neutrofílico (seta vermelha) e agregados plaquetários (seta preta tracejada). Aumentos (A) 400X, (B) 1000X.

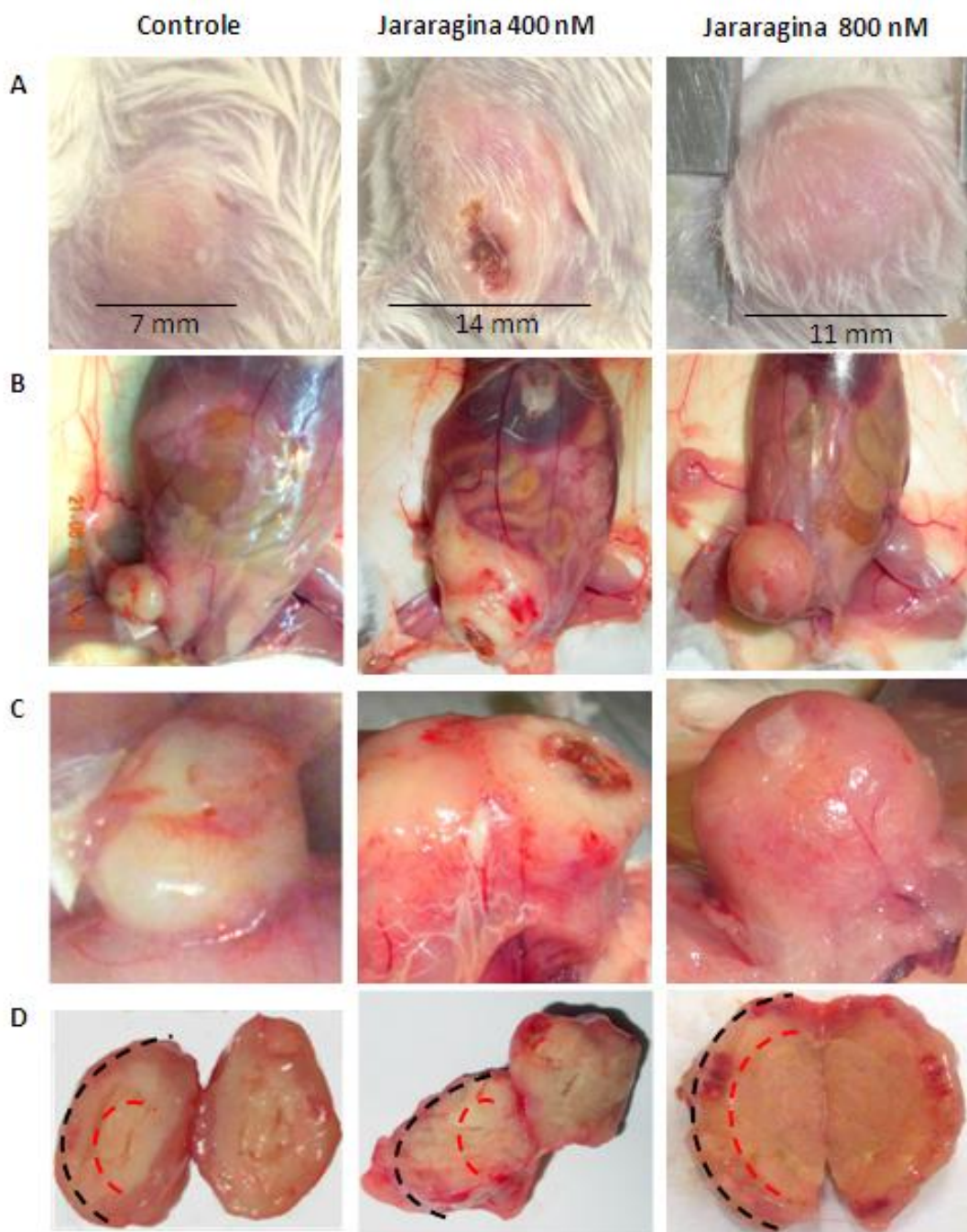
3.3.2.3 Análise macroscópica dos tumores e órgãos internos após a necropsia dos animais portadores do TES

Durante a necropsia foram avaliados os aspectos macroscópicos do tumor, presença de lesões ou injúria causadas pela administração da toxina, formação de metástase em órgãos, linfadenopatias e áreas hemorrágicas.

Na necropsia, independente do grupo, o tumor localizava-se na derme subcutânea e sem invasão da musculatura subcutânea e da cavidade abdominal. Os aspectos macroscópicos dos tumores do grupo controle apresentaram-se semelhantes, com massa tumoral simétrica, superfície lisa e coloração esbranquiçada com volume variando de 0,7 a 0,9 cm³. Nos grupos tratados com jararagina os tumores apresentaram-se assimétricos com aspectos diversos como hiperemia, fibrose e ulceração, com volumes variando de 1,2 até 1,9 cm³ (Figura 56A).

Após a retirada do revestimento do tecido cutâneo foram observadas áreas de fibrose e pontos de hemorragia com hiperemia nos tumores dos grupos tratados com jararagina, quando comparados ao controle. Também foi observado o aumento do volume dos linfonodos inguiniais laterais ao tumor. Este aumento foi significativo nos grupos tratados com a jararagina em ambas as concentrações (Figura 56B). Os tumores, quando ressecados mostraram-se delimitados pela formação de tecido capsular. Os tumores do grupo controle apresentaram-se com menor irrigação, coloração esbranquiçada. Entretanto, os grupos tratados com jararagina apresentaram-se com alta vascularização, hiperemia e formação de tecido fibroso (Figura 56C). Após o corte transversal do tecido tumoral, os tumores do grupo controle mostraram consistência frouxa, enquanto que os do grupo controle apresentaram-se consistência densa e áreas de necrose com pigmentação escurecida (Figura 56D).

Figura 56 - Aspectos macroscópicos representativos após a necropsia em camundongos BALB/c portadores do TES implantado na 9ª glândula mamária abdominal direita, após 49 dias de tratamento com jararagina 400, 800 nM e grupo controle.

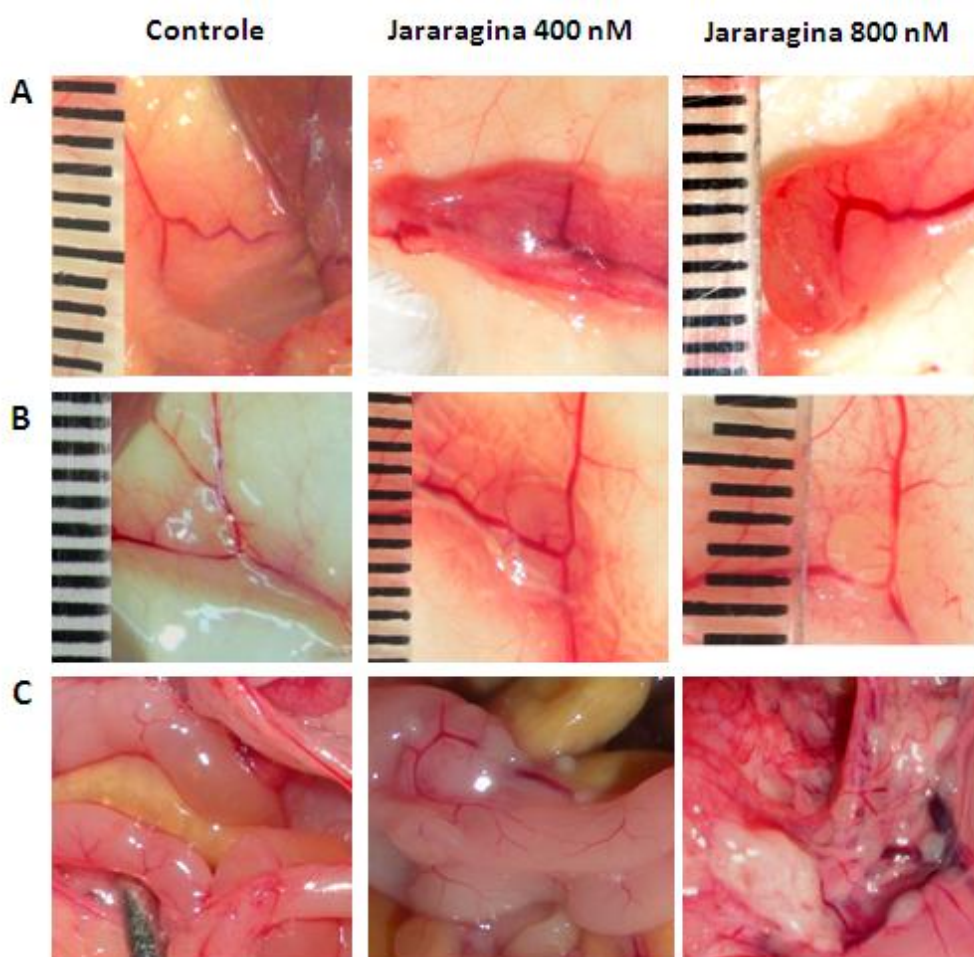


(A) Aspecto macroscópico do TES antes da excisão do tumor, ulceração e hiperemia são observados nos grupos tratados em comparação ao controle; (B) Aspecto macroscópico do tumor e linfonodo inguinal regional; (C) Aspecto macroscópico do tumor ressecado, observa-se presença de

áreas vascularizadas com aparente aumento da permeabilidade vascular periférica nos tumores tratados com jararagina; (D) aspecto interno do tumor após resecção mostrando as áreas periférica e medular.

O tratamento com a jararagina provavelmente foi capaz de induzir uma reação inflamatória responsável pela resposta imunitária nos camundongos portadores do TES. Desta forma, houve aumento significativo no volume dos linfonodos inguinais nos grupos tratados com a jararagina 400 e 800 nM, quando comparados ao grupo controle (Figura 57A). Da mesma forma, os linfonodos da cavidade abdominal encontraram-se com maior volume em relação ao controle, como mostrado na figura 57 B.

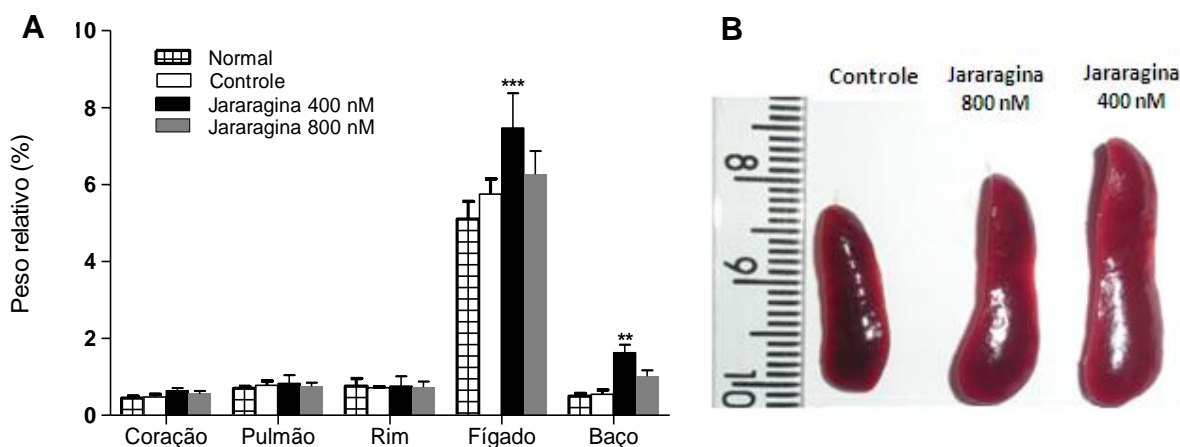
Figura 57 - Aspectos macroscópicos dos linfonodos inguinais e retroperitoneais dos camundongos portadores do TES, após 49 dias de tratamento.



Linfonodo inguinal regional direito (A) e contra-latero izquierdo (B). Aspecto interno da cavidade abdominal (C) nota-se que o tratamento com jararagina induz aumento da vascularização e volume dos linfonodos retroperitoneais.

Não foi detectada macroscopicamente a formação de massas ou metástases após o tratamento com jararagina. O peso dos órgãos internos e o peso relativo, mostrou que o tratamento com a toxina na concentração de 400 nM induz aumento significativo ($p < 0,001$) do fígado e baço em relação ao grupo controle (Figura 58A). A porcentagem média do aumento do peso relativo nos grupos tratados com jararagina nas concentrações de 400, 800 nM e controle foi $7,5\% \pm 0,9$, $6,3\% \pm 0,6$ e $5,8\% \pm 0,4$ para o fígado, e $1,6\% \pm 0,21$, $1,0\% \pm 0,16$, $0,6\% \pm 0,14$ para o baço, respectivamente. A imagem macroscópica do tamanho do baço está apresentada na figura 58B. Os demais órgãos internos não apresentaram diferenças significantes entre os tratamentos, como também nada digno de nota.

Figura 58 - Peso dos órgãos internos dos camundongos BALB/c portadores do TES tratados com jararagina, grupo controle e normal.

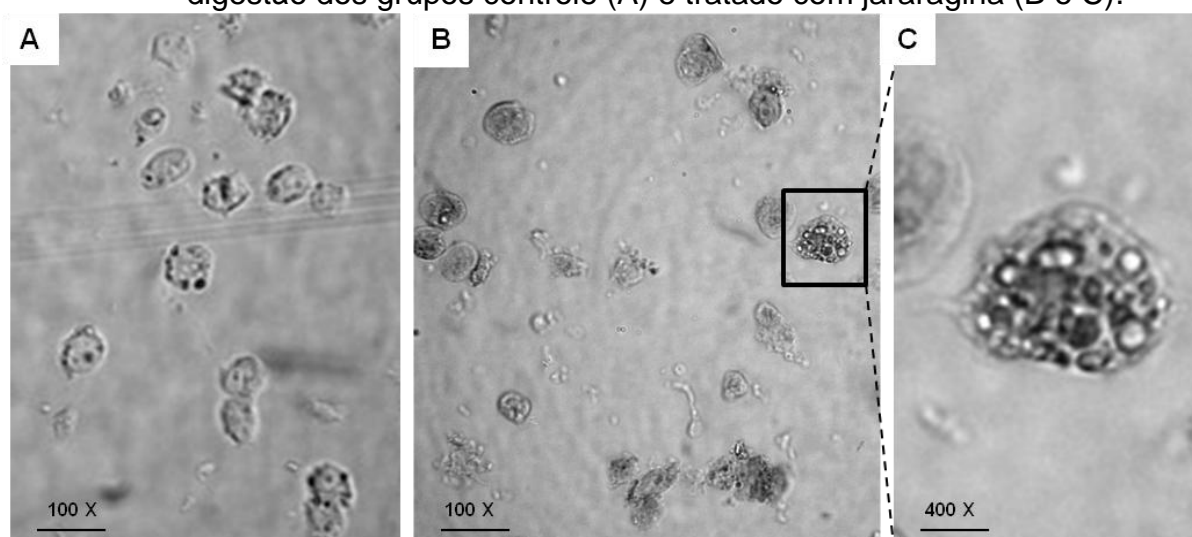


(A) Gráfico de barras do peso dos órgãos dos grupos tratados com jararagina, controle e normal sem tumor. Observa-se aumento significativo no peso relativo do fígado e baço do grupo tratado com jararagina 400 nM em comparação ao controle. Valores expressos em porcentagem do peso do órgão em relação ao peso corpóreo. Diferenças estatísticas obtidas pelo teste de Variância de ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey-Kramer, (B) Fotografia comparativa do volume do baço dos grupos.

3.3.2.4 Análises das populações celulares e ciclo celular no TES por citometria de fluxo

A análise por citometria de fluxo das populações celulares no TES ortotópico foi realizada nas áreas medular e periférica do tumor, conforme destacado na Figura 54D. O aspecto morfológico das células após digestão do tumor esta apresentada na figura 59.

Figura 59 – Aspecto morfológico das células do TES – porção periférica após digestão dos grupos controle (A) e tratado com jararagina (B e C).

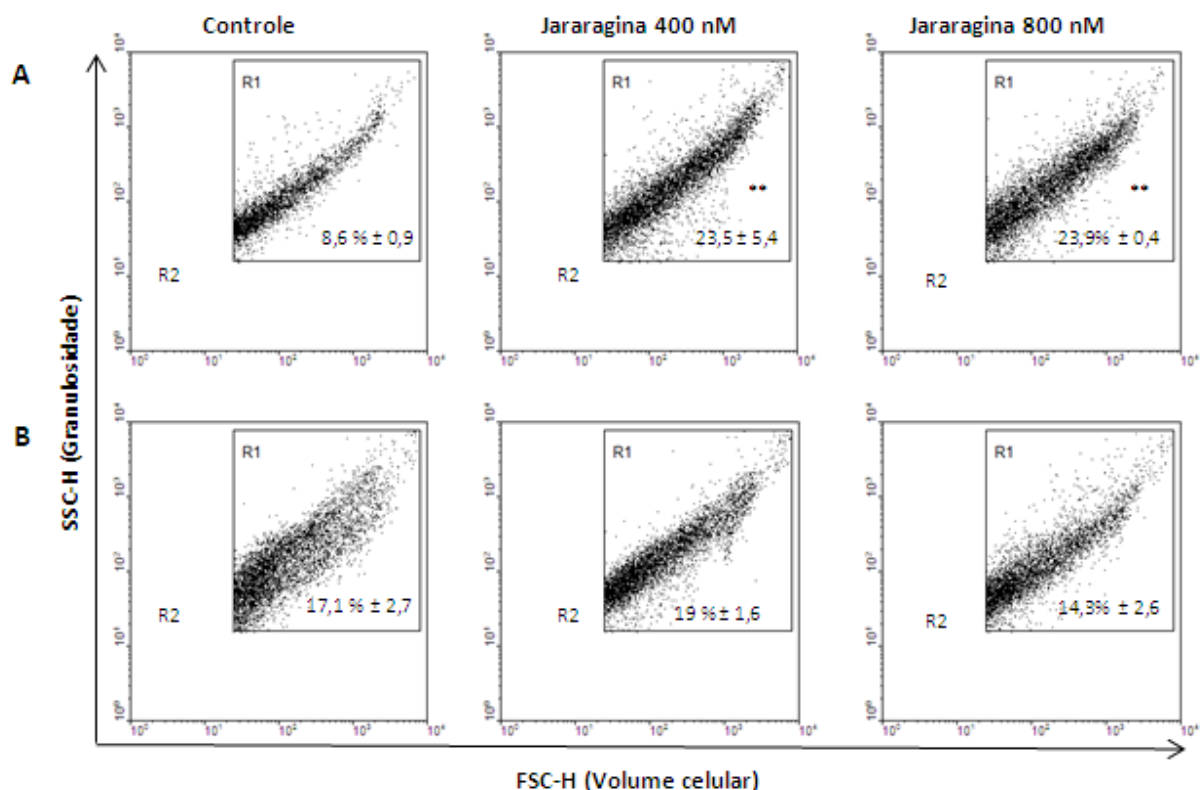


Os critérios para a análise e definição das diferentes populações foram o volume e a granulosidade das células analisadas na porção medular e periférica do tumor pelo programa WinMDI. Após a aquisição no citômetro de fluxo, os resultados mostraram duas populações celulares denominadas R1 e R2, com aumento significativo ($p < 0,001$) na população R1 medular do tumor nos grupos tratados com a jararagina. As médias \pm desvio padrão de cada grupo experimental estão apresentados na figura 60.

A população localizada no quadrante R1 é uma população de células tumorais de grande, e intermediário volume celular, além da presença de células inflamatórias. Esta população localizada no quadrante R1 apresentou aumento estatístico significativo na região medular do tumor nos grupos tratados com jararagina 400 e 800 nM (Figura 60A), enquanto na região periférica não houve diferenças estatísticas (Figura 60B). A população localizada no quadrante R2 foi

excluída da apresentação gráfica por não apresentar diferenças significativas quantitativas entre os grupos de tratamento nas regiões medulares e periféricas.

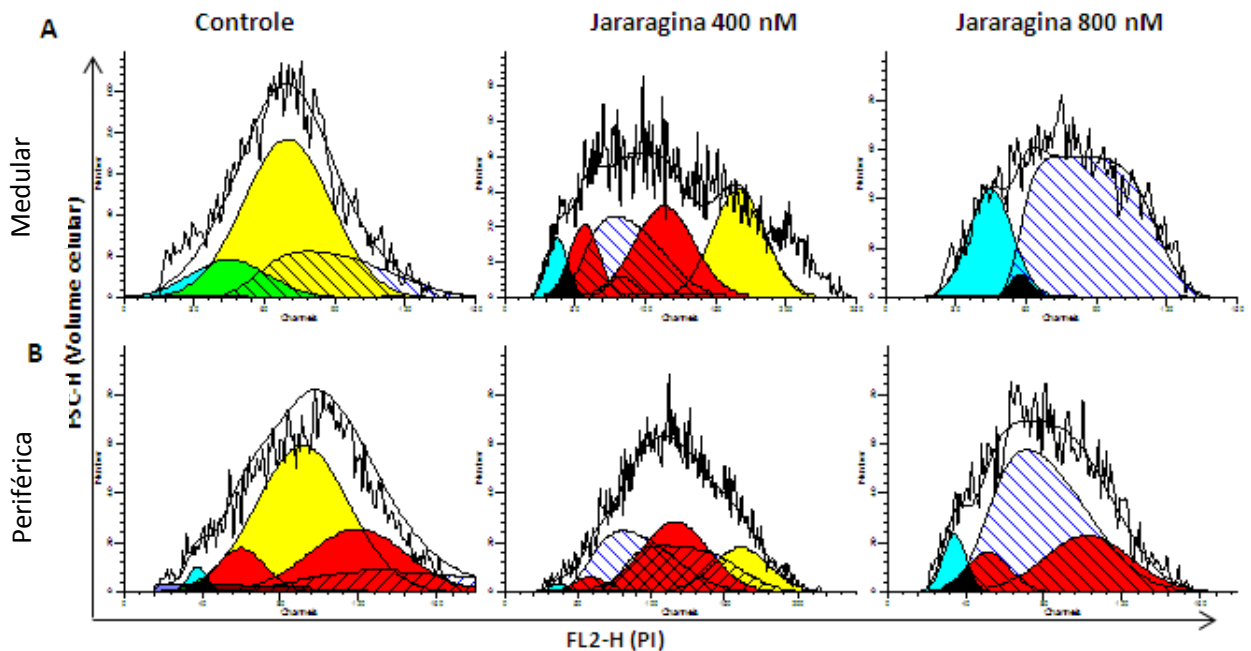
Figura 60 - Gráficos do tipo *Density Plot* adquiridos no citômetro de fluxo representativos das populações celulares presentes nas áreas medular (A) e periférica (B) do TES, após 49 dias de tratamento com jararagina 400 e 800 nM, e grupo controle.



Diferenças estatísticas significativas, teste de variância de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Variância de Tukey Kramer, ** $p < 0,01$.

A análise das fases do ciclo celular mostrou que os tumores dos grupos tratados com jararagina apresentou maior proporção de células diploides (população em vermelho) e menor proporção de células aneuploides (população amarela), quando comparadas ao grupo controle (Figura 61). Na população de células diploides há um aumento da fase S na porção medular e periférica do tumor, enquanto há um aumento nas fases do ciclo em G0/G1 e G2/M na porção periférica, nos grupos de tratamento com a jararagina em ambas as concentrações (Tabela 10).

Figura 61 -. Histogramas representativos das fases do ciclo celular nas áreas medular (A) e periférica (B) do TES, após 49 dias de tratamento.



A cor azul indica a proporção de células em apoptose, cor branca indica as células aneuploides, a cor amarela células diploides, e a cor vermelha as fases G0/G1 e G2/M, a cor branca com linhas indica a fase S,

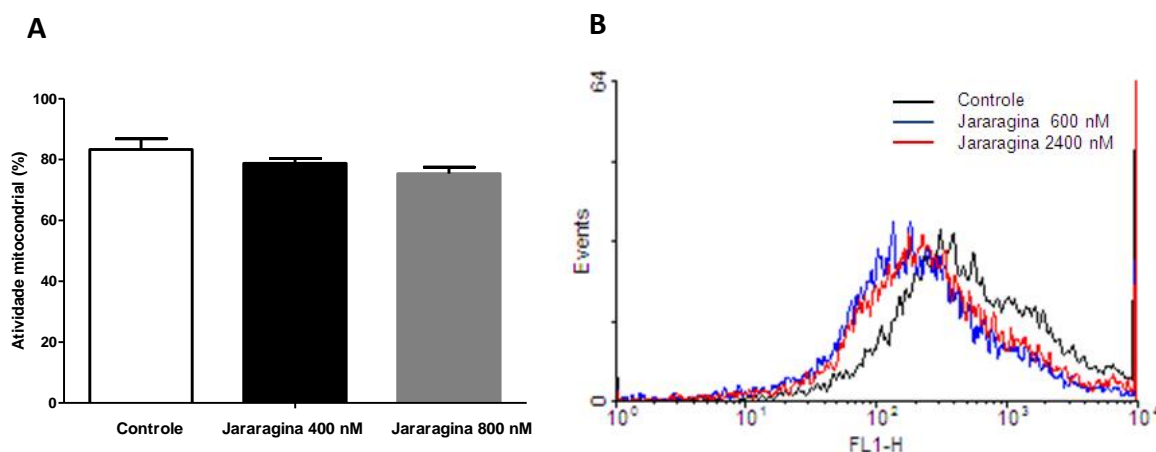
Tabela 10 - Populações de células totais nas fases do ciclo celular nas porções medular e periférica do TES, grupos tratados com jararagina e controle.

PLOIDIA	Porção medular do tumor			Porção periférica do tumor		
	Controle	Jararagina 400nM	Jararagina 800nM	Controle	Jararagina 400nM	Jararagina 800nM
DIPLOIDE (%)	33,4 ± 3,8	69,5 ± 8,4	99,8 ± 7,4	27,7 ± 2,1	58,7 ± 6,8	99,6 ± 13
G0/G1	25,8 ± 1,5	15,5 ± 2,6	3,6 ± 0,4	2,5 ± 0,4	4,9 ± 0,5	8,8 ± 2,7
G2/M	71,2 ± 9,4	41,2 ± 5,9	4,7 ± 0,3	1,8 ± 0,3	48,5 ± 6,2	25,1 ± 2,1
S	3,0 ± 0,6	42,3 ± 4,7	91,6 ± 8,1	95,7 ± 12	45,5 ± 6,8	66,1 ± 6,4
ANEUPLOIDE (%)	66,6 ± 5,3	33,0 ± 5,8	0,1 ± 0,0	72,3 ± 5,2	41,3 ± 3,2	0,1 ± 0,0
G0/G1	5,3 ± 4,2	8,9 ± 1,6	81,2 ± 6,2	27,3 ± 1,8	12,1 ± 3,1	25,9 ± 3,8
G2/M	36,7 ± 2,7	87,7 ± 9,1	15,1 ± 1,1	29,2 ± 0,3	30,7 ± 2,1	14,5 ± 3,5
S	60,2 ± 6,8	3,5 ± 0,6	3,8 ± 0,5	43,5 ± 3,6	57,3 ± 7,2	61,1 ± 8,2
TOTAL S	53,5 ± 3,7	29,5 ± 2,7	96,6 ± 4,3	27,2 ± 7,8	53,5 ± 7,1	66,1 ± 7,3
APOPTOSIS	0,9 ± 0,1	9,7 ± 2,5	14,7 ± 2,6	1,8 ± 0,2	1,2 ± 0,1	6,4 ± 0,3
DEBRIS	1,77 ± 0,2	4,1 ± 0,6	4,16 ± 0,8	1,5 ± 0,3	1,9 ± 0,3	1,8 ± 0,1

3.3.2.5 Análise do Potencial Elétrico Mitocondrial ($\Delta\psi_m$) no TES

A avaliação do potencial elétrico mitocondrial foi realizada com a sonda fluorescente Rodamina 123 por citometria de fluxo. Os resultados no TES mostraram que não houve diferenças significativas entre os tratamentos com Jararagina nas concentrações 400 e 800 nM, e o grupo controle, sendo as médias da atividade mitocondrial de $84,4\% \pm 1,6$; $78,6\% \pm 1,2$; e $75,9\% \pm 1,1$ para os grupos controle, jararagina 400 e 800 nM, respectivamente (Figura 62).

Figura 62 - Potencial elétrico mitocondrial do TES dos grupos tratados com jararagina e grupo controle.



(A) Gráfico de barras da atividade mitocondrial ($\Delta\psi_m$) expressa em porcentagem média \pm dp (B) Histograma do tipo overlay representativo da atividade mitocondrial nos tumores sólidos, adquirido pelo programa WinMDI2.9.

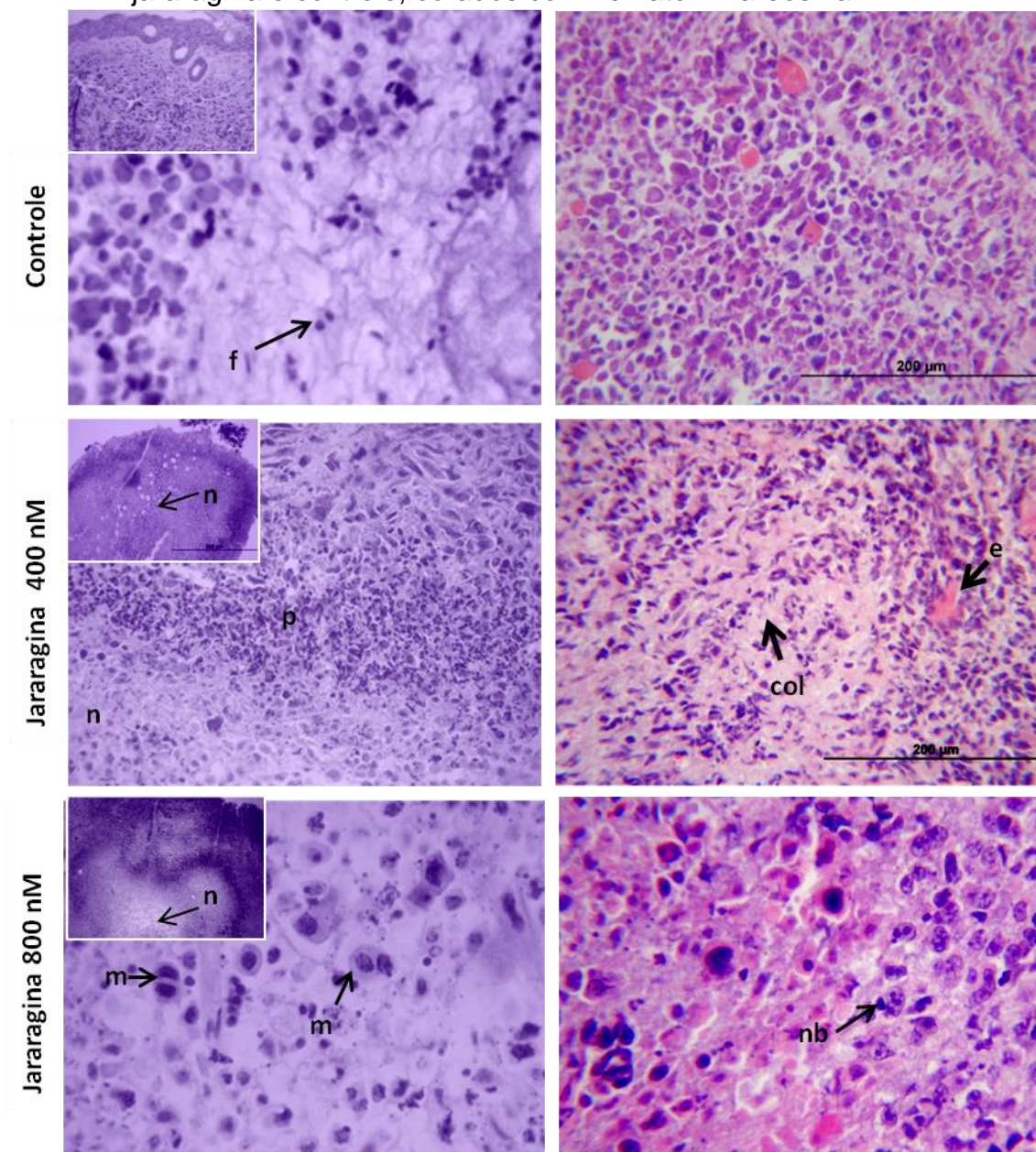
3.3.2.6 Análise histopatológica das amostras de TES

No estudo histológico do TES foi utilizada a coloração Hematoxilina-Eosina (HE) que permite visualizar a arquitetura do tecido e células, áreas de necrose, proliferação (mitose) e edema. A coloração de Picrosirius evidencia as fibras de colágeno, enquanto a coloração tricrômico de Masson é utilizada para organização do tecido conjuntivo.

A análise histológica das amostras dos tumores dos camundongos do grupo controle por HE mostrou os detalhes da superfície do tumor com a formação do tecido capsular, massa celular desorganizada e áreas de necrose. Foram observadas células neoplásicas em mitose, com núcleo redondo e volumoso ocupando a totalidade do seu citoplasma, como também a presença de fibroblastos e fibrócitos na porção central do tumor. Além das áreas de necrose foram observadas células tumorais com figuras de proliferação como anisocariose (inclui núcleos bizarros), anisocitose, figuras de mitose e outras células com núcleos picnóticos e hiper cromáticos com intensa atividade nuclear (Figura 63, controle).

No tratamento com jararagina 400 e 800 nM foram observadas o aumento de áreas de necrose (n) contínuas a áreas de intensa proliferação celular com aumento do tecido conectivo fibroso e deposição de fibrina e colágeno proporcionando o aspecto desorganizado. Observa-se a presença de moderado processo inflamatório com edema acidófilo e alta proliferação celular (p). A porção periférica do tumor apresenta pouco tecido conectivo e na sua parte central observa-se áreas necróticas (n) difusas associadas a processos ulcerativos do tumor. No tratamento com jararagina 800 nM há o aumento de áreas de necrose difusa, quando comparadas ao tratamento com jararagina 400 nM e grupo controle (Figura 63, jararagina).

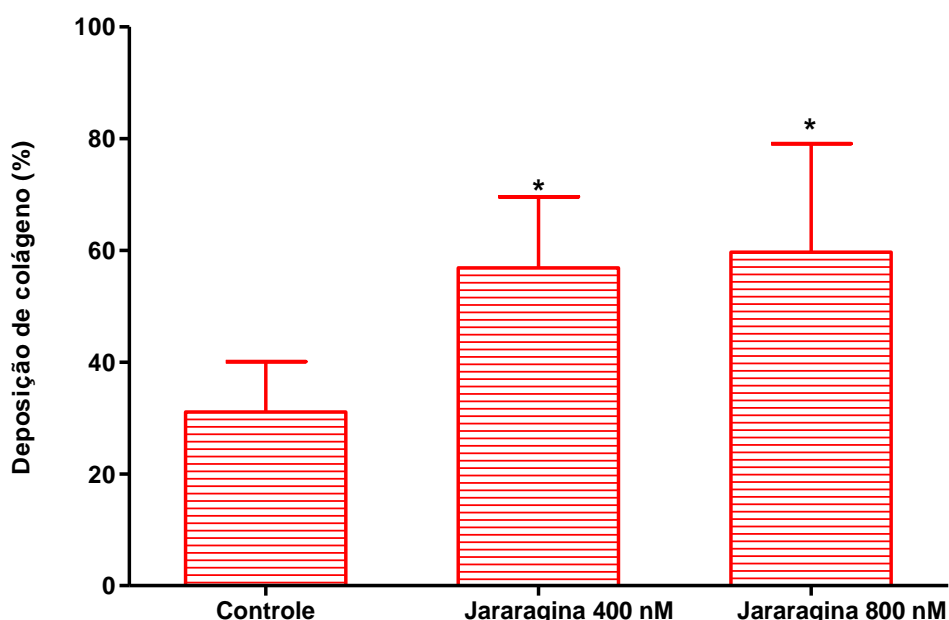
Figura 63 – Fotomicrografia das amostras do TES dos grupos tratados com jararagina e controle, corados com hematoxilina-eosina.



Inset: detalhe em menor aumento (40X) da área de necrose. Presença de maiores áreas de necrose (n) nos grupos tratados com jararagina em comparação ao controle. Observa-se presença de fibrócitos (f) na porção central do tumor do grupo controle, e massa celular com distribuição homogênea, enquanto que nos grupos tratados com jararagina 400 e 800 nM estão representadas as áreas de necrose (n) contínuas a áreas de intensa atividade proliferativa (p). No estroma há a presença de fibras de colágeno (col) depositado entre as células com áreas de edema (e), assim como figuras de células em mitose (m) e células com núcleos bizarros. Aumento 200X e 400X.

A avaliação da porcentagem de colágeno nos tumores corados por Picrosirius-red, quantificados pelo programa Imagem J, mostrou aumento significativo na proporção de colágeno imaturo nos grupos tratados com jararagina 400 e 800 nM, sendo as médias $56,9\% \pm 12,7$ e $59,7\% \pm 19,4\%$, respectivamente, sem diferenças entre os grupos, enquanto o grupo controle apresentou $31\% \pm 9,5$ de colágeno (Figura 64).

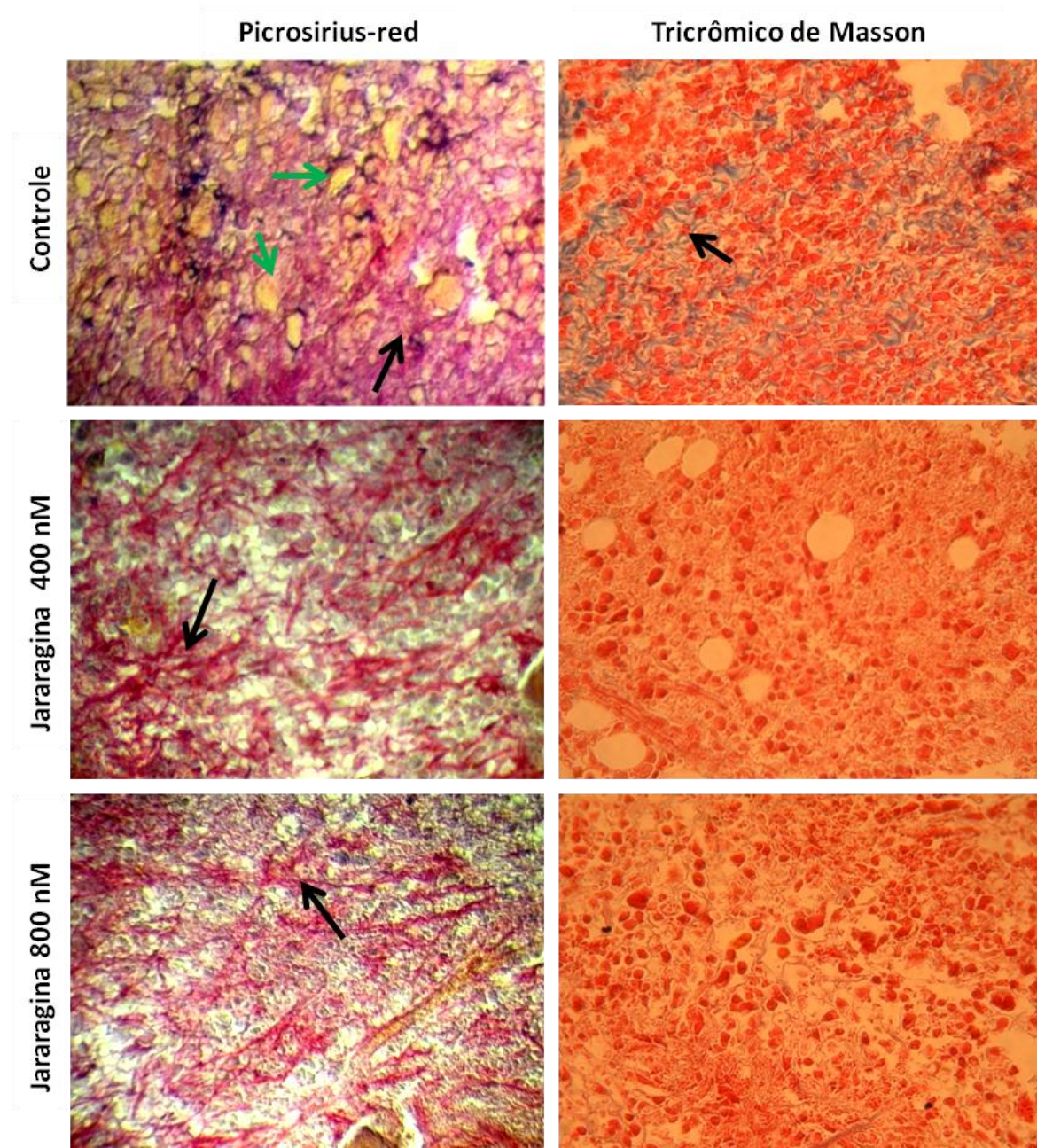
Figura 64 - Porcentagem da síntese de colágeno imaturo no TES dos grupos tratados com jararagina e grupo controle.



Valores expressos em porcentagem média de colágeno \pm dp, analisados pelo teste de Variância de ANOVA de uma via e comparação múltipla de Tukey Kramer (n=10).

Na coloração por Picrosirius-red, observam-se áreas de fibrose focal discreta grado I, com deposição de colágeno maduro e imaturo no grupo controle, enquanto nos grupos tratados com a jararagina 400 e 800 nM, observa-se fibrose multifocal extensiva difusa e irregular, grado II, com presença de tecido conectivo imaturo e irregular, além de tecido conectivo fibroso. Na coloração de tricrômico de Masson observa-se abundante tecido conectivo periférico com fibrose central no grupo controle, enquanto nos grupos tratados com jararagina em ambas as concentrações foram observadas a presença de fibrose difusa (Figura 65).

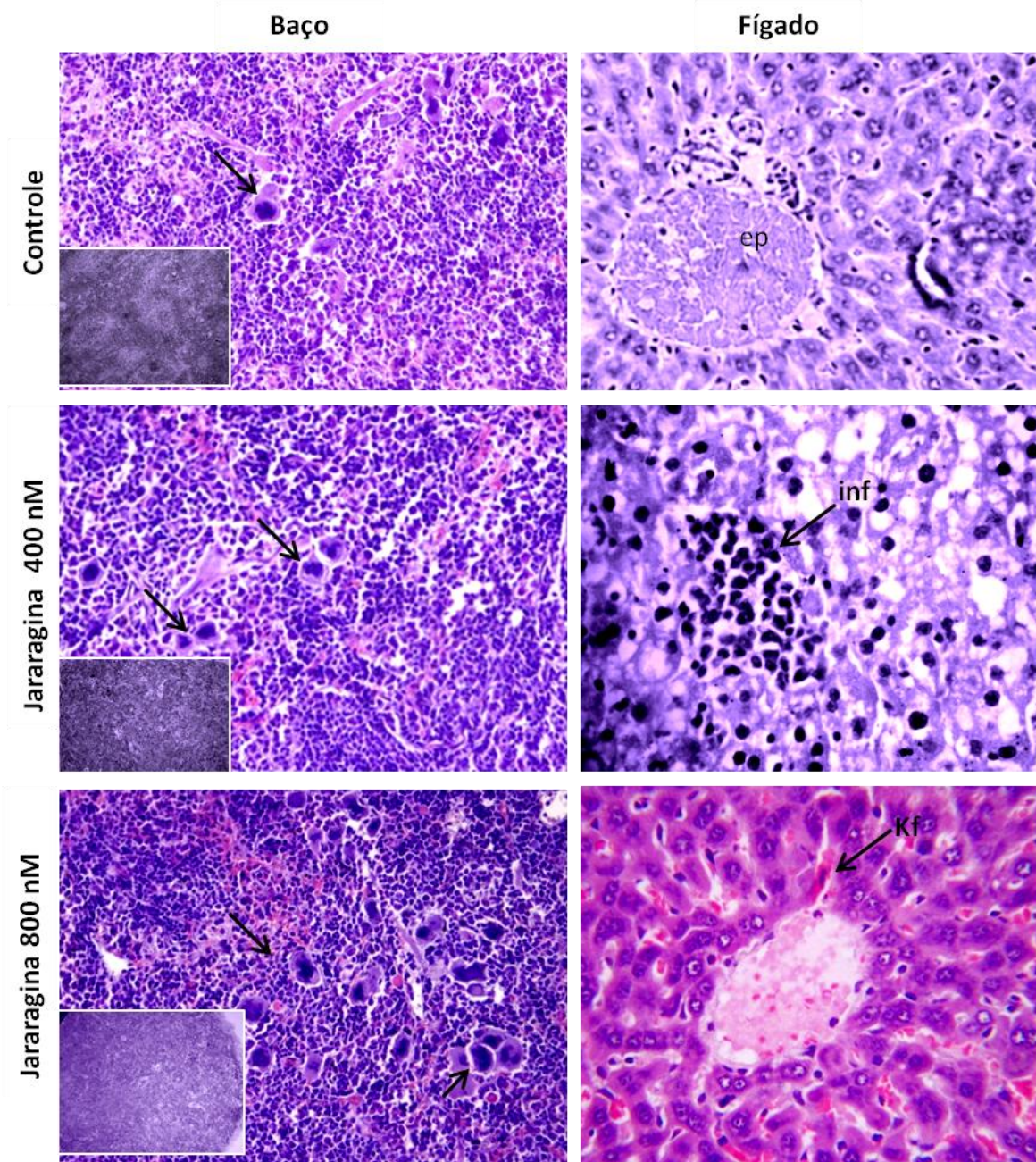
Figura 65 - Análise citológica: Picrosirius-red e Tricrômico de Masson das amostras de TES dos grupos tratados com jararagina e controle.



Na coloração de Picrosirius – red notas-se a deposição de colágeno maduro (seta verde-amarelo) e imaturo (seta preta - vermelho) no controle, enquanto nos grupos tratados com a jararagina há aumento das fibras de colágeno imaturo. A coloração Tricrômico de Masson mostrou abundantes fibras colágenas (azul) no grupo controle e predomínio das fibras elásticas (vermelho) nos grupos tratados com jararagina. Aumento (200x)

O baço, corado pelo HE mostrou a organização das áreas correspondentes à polpa branca e vermelha no grupo controle, enquanto nos grupos tratados com a jararagina há perda da delimitação dessas áreas (inset). Também foi observado o aumento significativo de células hematopoiéticas nos grupos tratados com jararagina 400 e 800 nM. No fígado, todos os grupos apresentaram parênquima hepático com estrutura normal e veia e artéria hepática cheia (espaço porta), os grupos tratados com jararagina apresentaram presença de infiltrado inflamatório (inf) e hepatócitos com 2 até 4 núcleos, indicando alta atividade celular, além da presença de maior número de células de Kuffer, em comparação ao grupo controle (Figura 66).

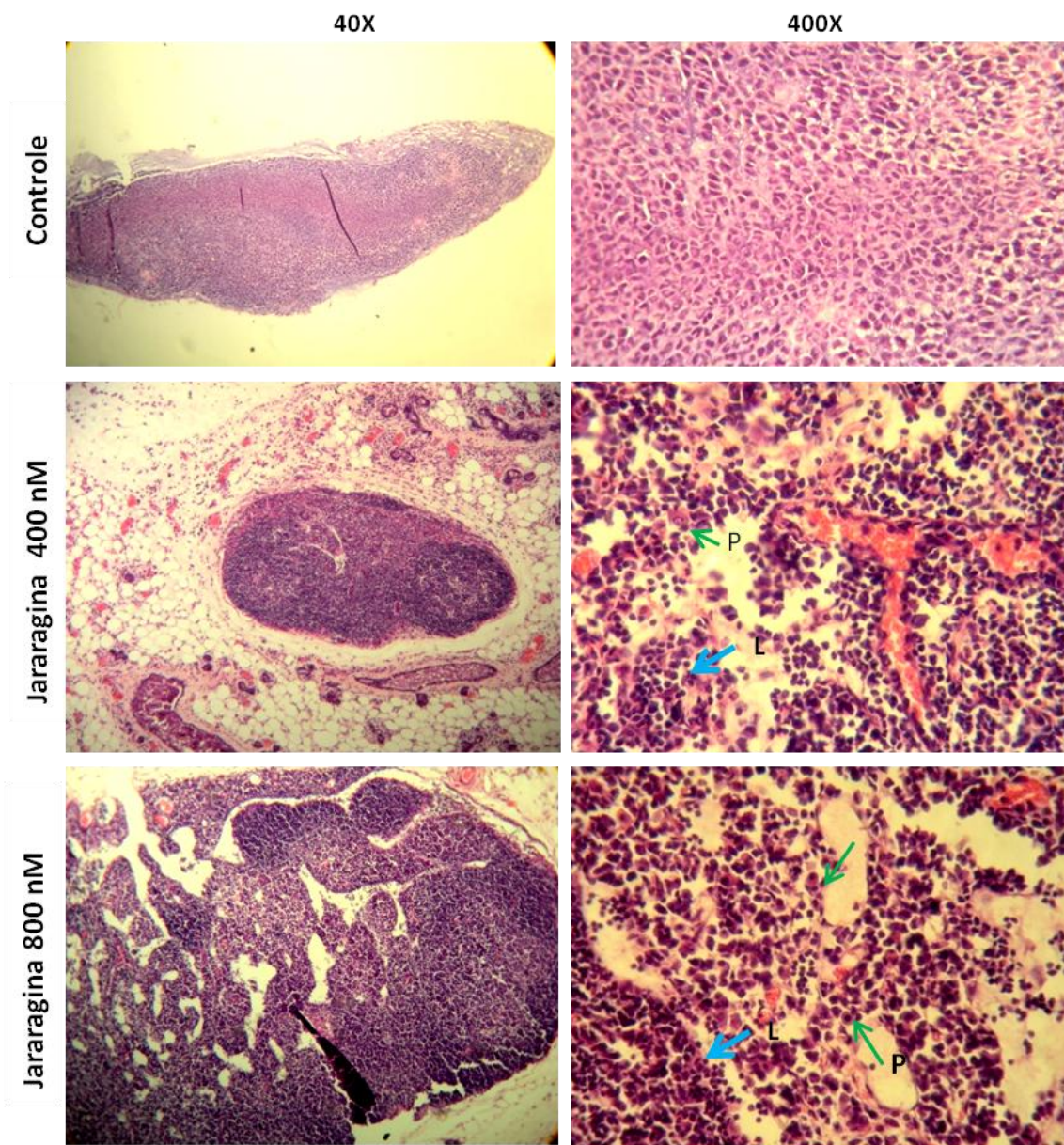
Figura 66 - Fotomicrografia dos parênquimas esplênico e hepático dos camundongos BALB/c portadores de TES dos grupos tratados com jararagina e controle.



Inset nota-se em menor aumento vista panorâmica do baço com delimitação das áreas da polpa branca e vermelha, enquanto estas bordas são perdidas nos grupos tratados com jararagina (hiperplasia), Nas setas pretas observa-se aumento das células hematopoiéticas nos grupos tratados com jararagina 400 e 800 nM. No parênquima hepático do grupo controle observa-se a estrutura normal da veia e artéria hepática (espaço porta), enquanto nos grupos tratados com jararagina observa-se a presença de infiltrado inflamatório (inf) entre os hepatócitos que apresentam distribuição irregular dos sinusoides, com multinucleação e abundantes células de Kuffer (Kf). Aumento 400 X (baço), 1000x (fígado).

A análise histológica dos linfonodos inguinais dos camundongos com TES tratados com jararagina mostrou hiperplasia linfoide, com figuras de plasmócitos (p), ninhos de linfócitos (l), e alteração na sua estrutura, revelando o aumento do tamanho no corte transversal do linfonodo (Figura 67); enquanto que, no grupo controle há presença de estrutura homogênea.

Figura 67 - Fotomicrografia dos linfonodos inguinais dos camundongos BALB/c portadores de TES grupos tratados com jararagina e controle.



Vista panorâmica do linfonodo com aumento do tamanho das áreas dos linfonodos nos grupos tratados com jararagina (hiperplasia linfóide), A maior aumento observa-se as células hematopoiéticas e neoplásicas nos grupos tratados com jararagina 400 e 800 nM.

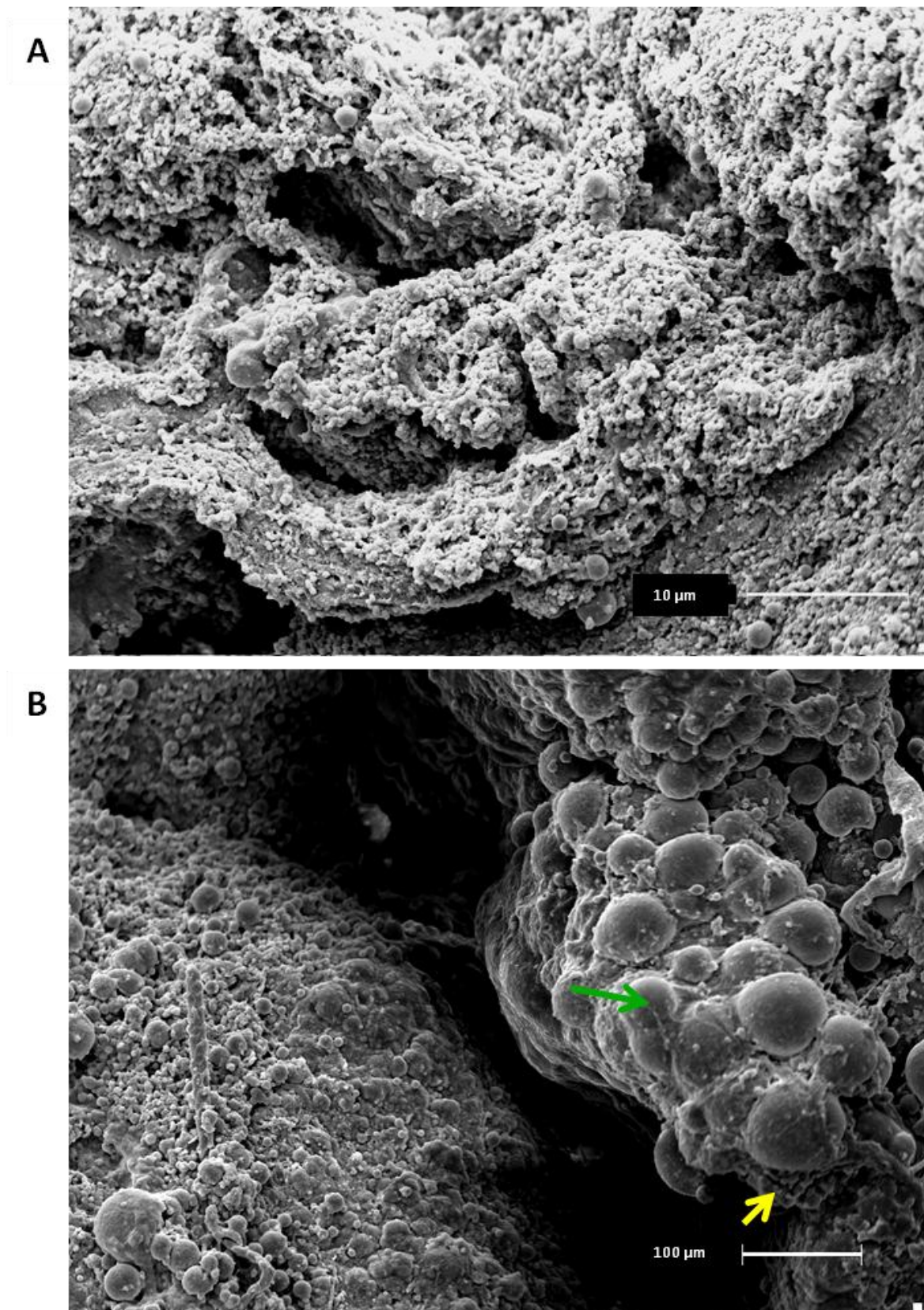
3.3.2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras dos TES do grupo controle analisados por MEV mostram massa tumoral com grande número de células compactadas e entremeadas por elementos fibrosos da matriz extracelular. Notam-se em destaque vasos sanguíneos neoformados e fenestrados, raros glóbulos vermelhos dispersos na massa tumoral e raras células inflamatórias (Figura 68).

As amostras do TES tratados com jararagina na concentração de 400 nM mostraram as células tumorais na superfície cortical da massa tumoral, com perda nas conexões com a matriz extracelular, rodeadas de abundante infiltrado inflamatório, assim como a presença de vasos sanguíneos com menor diâmetro e raras fenestrações e raros glóbulos vermelhos (Figura 69).

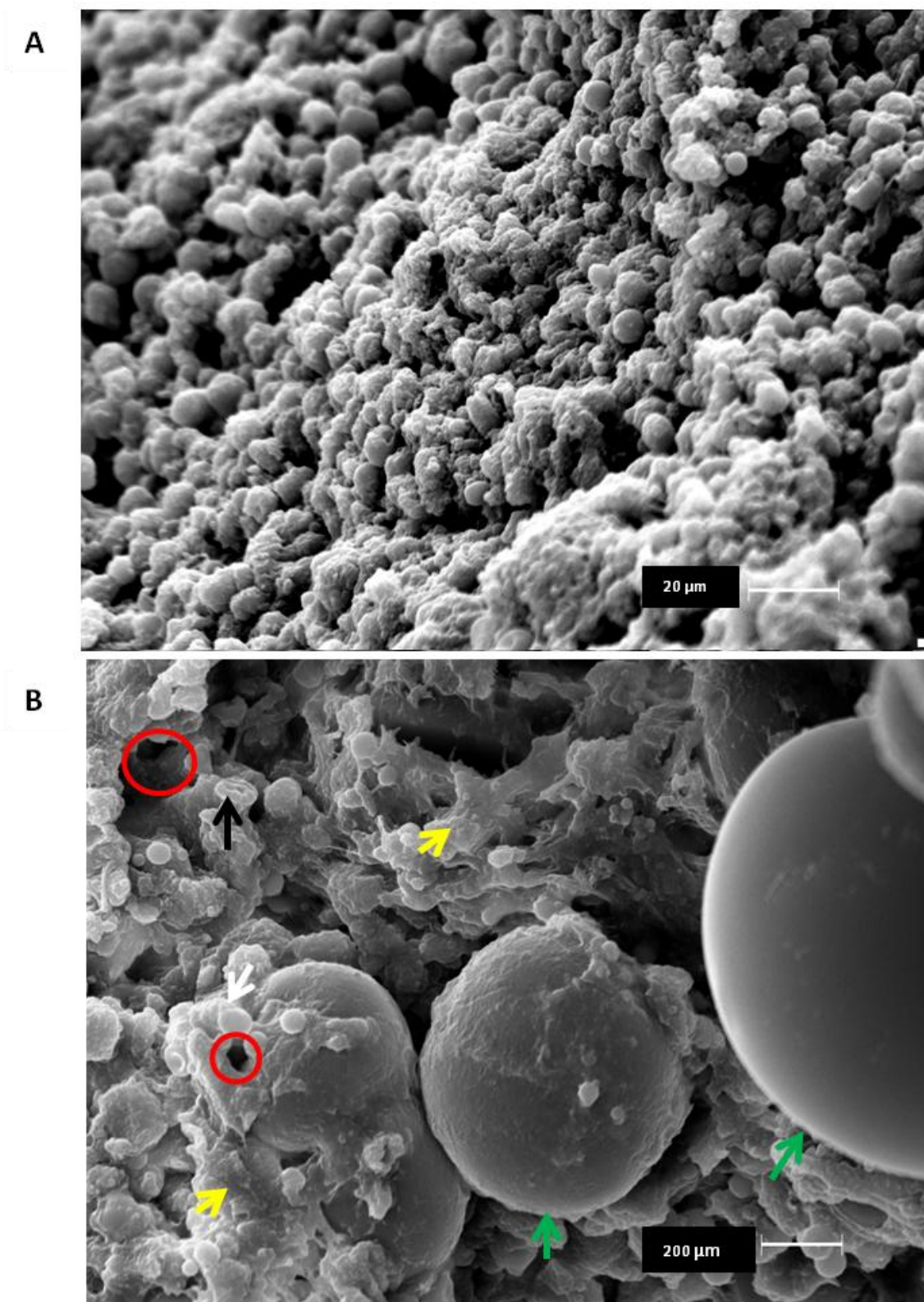
As análises realizadas no MEV dos tumores dos animais tratados com jararagina 800 nM mostraram células tumorais com relevo e conexões com a matriz extracelular, como também inseridas nas fibras da matriz, rodeadas por abundante infiltrado inflamatório. A presença de vasos sanguíneos em menor densidade também foi acompanhada pelo menor diâmetro e fenestrações (Figura 70).

Figura 68 - Eletromicrografia das amostras do TES grupo controle obtido por MEV.



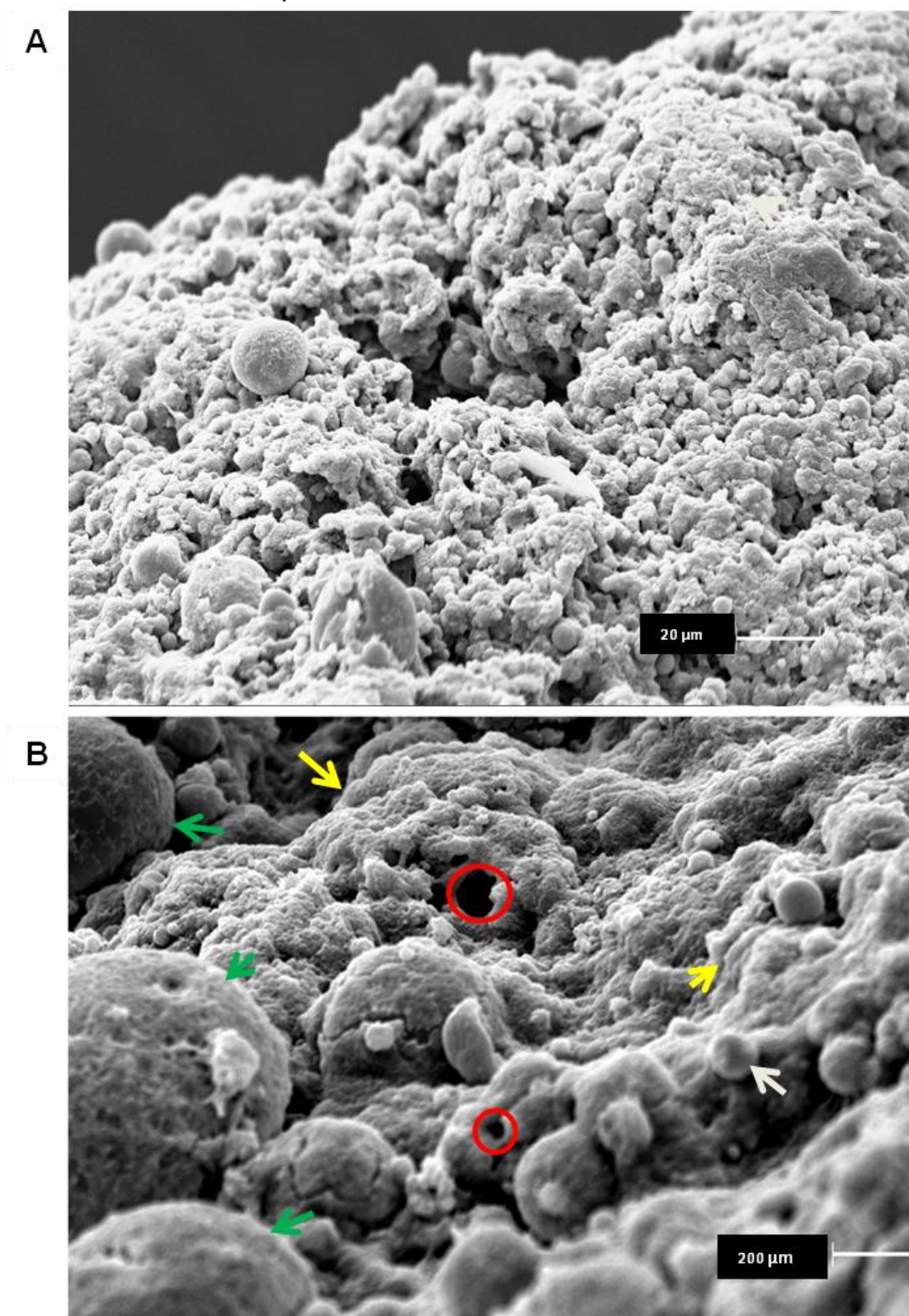
(A) observar a organização da matriz extracelular com abundantes células tumorais e raras células inflamatórias, (B) Observar células tumorais (seta verde) dispostas entre a matriz extracelular (seta amarela) e raro infiltrado inflamatório (seta brancas) e vasos sanguíneos (círculo vermelho) e glóbulos vermelhos (seta preta).

Figura 69 - Eletromicrografia das amostras do TES grupo tratado com jararagina 400 nM, obtida por MEV.



(A) Observar a organização da matriz extracelular ao redor das células tumorais e infiltrado moderado. (B) Observar a organização da matriz extracelular e o infiltrado inflamatório no TES obtidas por MEV. Destaque células tumorais (seta verde), organização fibrilar da matriz extracelular (seta amarela) e o infiltrado inflamatório (seta branca), vasos sanguíneos fenestrados (círculo vermelho) e glóbulos vermelhos (seta preta).

Figura 70 - Eletromicrografia das amostras do TES grupo tratado com jararagina 800 nM, obtida por MEV.



(A) Observar a organização da matriz extracelular com estruturas fibrilares em maior densidade e infiltrado inflamatório intenso, (B) Observar as células tumorais (seta verde) inseridas na matriz extracelular (seta amarela) e rodeadas por abundante infiltrado inflamatório (seta branca), assim como presença de vasos sanguíneos em menor diâmetro organizados (círculo vermelho).

4 DISCUSSÃO

A jararagina, proteína isolada do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, tem mostrado atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* em células de melanoma maligno e camundongos com melanoma, segundo resultados obtidos por nosso grupo (CORRÊA et al., 2002; KLEIN et al., 2010; MARIA; VASSÃO; RUIZ, 2003). Baseados nestes resultados, o presente estudo teve como finalidade avaliar os efeitos da jararagina em células tumorais de mama humana e murina, e *in vivo* no modelo experimental de adenocarcinoma de mama de Ehrlich, formas ascítica e sólida- ortotópico em camundongos.

As pesquisas em sistema de cultura de células e em modelos animais têm avaliado venenos procedentes de diversas espécies de serpentes e os efeitos nos diversos tipos de câncer, com o intuito de encontrar substâncias com possível potencial terapêutico, atuando como agente único ou como adjuvante (SON et al., 2007; SONG et al., 2012; SWENSON et al., 2005; YEH et al., 2001).

A atividade hemorrágica da jararagina foi avaliada na microvascularização de ovos embrionados, mostrando o efeito hemorrágico nas concentrações utilizadas neste projeto. Esta hemorragia está relacionada com a especificidade da jararagina pelas integrinas $\alpha_2\beta_1$ expressa em células endoteliais (MOURA-DA-SILVA et al., 2001). No estudo utilizado da MCA, há uma expressão acentuada destas integrinas durante o desenvolvimento embrionário, além da fragilidade dos capilares que estão constituídos por uma única camada de células endoteliais, aparecendo a lâmina basal no dia 8 (CIMPEAN; RIBATTI; RAICA, 2008), fato demonstrado pela hemorragia provocada pela jararagina nas concentrações de 400 e 800 nM.

Neste estudo, o tratamento *in vitro* com a jararagina, mostrou-se eficaz na capacidade de inibir o crescimento de células de tumor de mama humano e murino tratadas com diferentes concentrações de jararagina. A jararagina têm efeitos citotóxicos em células tumorais e normais de mama humana e murina. A viabilidade celular avaliada após 24, 48 e 72 horas, mostrou a redução da viabilidade celular tempo- concentração dependente. Concentrações superiores a 300 nM de jararagina levam a uma significativa diminuição da viabilidade celular e alterações morfológicas acentuadas como perda da aderência em células de mama humana MCF-7 e T47D.

A determinação dos efeitos da jararagina em células de fibroblastos humanos FN1 e murinos L929 normais, e célula endotelial humana HUVEC, compõe uma

importante etapa do tratamento, comprovando se o composto possui especificidade de ação em células tumorais ou se trata de um composto citotóxico para os tipos celulares. A concentração inibitória IC_{50} em células de fibroblastos humano e murino foi de 619 e 1355 nM, respectivamente, e de 560 nM para as células HUVEC, enquanto para as células de tumor de mama humana T47D e MCF-7 foi de 3170, 3980 nM respectivamente, e 598 nM para as células de carcinoma murino de Ehrlich, após 24 horas de tratamento.

Neste estudo, a menor IC_{50} apresentado em HUVEC, confirmam a sensibilidade da célula endotelial, provavelmente pela ligação da jararagina aos receptores integrina $\alpha_2\beta_1$, o que foi capaz de induzir morte celular por apoptose tipo anoikis. A morte desencadeada por anoikis, onde grande parte das células aderem se ao substrato, ocorre pela falta de sinais de sobrevivência induzida pela inadequada ou inapropriada interação célula –matriz, resultando em morte por apoptose, documentado em células epiteliais e endoteliais (FRISCH; FRANCIS, 1994; STUPACK; CHERESH, 2005). Morte por anoikis tem sido relatada em células endoteliais humanas HUVEC e células endoteliais murinas – tEnd após tratamento com jararagina, mostrando que a jararagina interfere com os contatos de adesão focal, e conseqüentemente induz apoptose por anoikis. Este efeito é completamente dependente da atividade catalítica da jararagina (BALDO et al., 2008; TANJONI et al., 2005)

Na linhagem de fibroblastos, os valores da IC_{50} mostraram a maior sensibilidade ao tratamento do fibroblasto humano em comparação ao fibroblasto murino. Os fibroblastos são células componentes da MEC, que se aderem às fibras de colágeno pelos receptores integrinas $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_1$, e são responsáveis pela formação e remodelação do tecido conjuntivo (MORAES; JOAZEIRO, 2005). A jararagina interfere com as integrinas $\alpha_2\beta_1$ expressos na superfície dos fibroblastos, este receptor modula a atividade de ligação com o colágeno fibrilar, promovendo a adesão (HYNES, 1992). A jararagina atua como um substrato mimetizador do colágeno, mantendo os eventos de sinalização intracelular. Do mesmo modo liga-se à superfície dos fibroblastos de maneira tempo-dependente, com aumento da expressão da integrina $\alpha_2\beta_1$ induzido após incubação com a jararagina, mas a ligação à superfície dos fibroblastos ocorre via uma ou mais interações específicas da jararagina, entre tanto, não se exclui o envolvimento de outros receptores na interação da jararagina - fibroblasto (ZIGRINO et al., 2002).

Fibroblastos peritoneais murinos A31 mostraram leves alterações no aspecto morfológico das culturas após 10 minutos de tratamento com 40 µg/mL de jararagina. Os efeitos promovidos pela toxina modificaram a rede de actina, mas não induziram morte por apoptose, enquanto nas mesmas concentrações estes efeitos estão associados a morte por apoptose indicando a seletividade pelas células endoteliais (TANJONI et al., 2005). Em fibroblasto humano HS-68, o tratamento com jararagina aumenta a expressão de genes codificantes das subunidades α_1 , α_2 , β_3 , β_5 das integrinas, e diminuem a expressão de α_6 (GALLAGHER et al., 2005), provavelmente por uma ou mais interações específicas da jararagina com os receptores de superfície dos fibroblasto, sugerindo o envolvimento de outras integrinas (ZIGRINO; DRESCHER; MAUCH, 2001).

Nosso grupo demonstrou que em fibroblastos humanos normais FN-1, o tratamento com jararagina 30 ng provocou aumento da expressão das integrinas β_4 , β_6 e β_7 , mostrando ter atividade apoptótica pelo aumento da expressão do gene CASP3. Em melanoma humano SKMEL-28, foi demonstrado que a jararagina induz discreta diminuição na expressão das subunidades α_4 , α_6 β_1 ; enquanto as subunidades α_v , α_1 , α_5 , β_2 , β_3 , β_4 e β_6 não sofreram alterações, indicando diferentes vias de regulação entre as células normais e tumorais (KLEIN et al., 2011).

Neste estudo, concentrações de 2400 e 4800 nM de jararagina, são eficientes na inibição da aderência das células de tumor de mama humana, caracterizadas por expressar outros tipos de integrinas e junções, como as E-caderinas. Estes eventos podem ser explicados pela inibição parcial ou total da adesão de células que expressam outros receptores integrinas ($\alpha_5\beta_1$ e α_6) específicos para outros ligantes como fibronectina e laminina, quando tratadas em concentrações maiores de 2000 nM (MOURA-DA-SILVA; MARCINKIEWICZ; NIEWIAROWSKI, 2001), e também à presença de motivos de adesão presentes nos domínios tipo-desintegrina e rico em cisteína (BALDO et al., 2010).

Em células de tumor de mama, as integrina $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_{10}\beta_1$ se encontram universalmente distribuídas, mas com níveis variáveis de expressão, demonstrando que há ligações ao colágeno e/ou laminina no estroma tumoral. Células normais de mama (184A1N4 e MCF-10A) e linhagens de células de tumor de mama positivas para o receptor de estrogênio (RE) e que expressam E-caderina (MCF-7, T47D, ZR75-1), podem se ligar a integrina $\alpha_2\beta_1$, como ao receptor de laminina. Inversamente, células de carcinoma da mama metastático RE-negativo que expressaram vimentina

(MDA-MB 231, MDA-MB 435 e MDA-MB 436), são incapazes de se ligar a laminina pela integrina $\alpha_2\beta_1$. Estes achados sugerem que a alteração da expressão de integrinas durante a transformação maligna, como a diminuição da integrina $\alpha_2\beta_1$ como ligante de laminina, parece estar associada a um aumento do fenótipo metastático e transição epitelio-mesenquimal (KAMATA et al., 2001; MAEMURA et al., 1995).

O tratamento das células de carcinoma mamário humano MCF7 e T47D com jararagina, neste estudo apresentaram os maiores valores de IC_{50} . A diferença do valor do IC_{50} das linhagens normais já descritas, a menor sensibilidade nas linhagens tumorais de mama humana supostamente está relacionada à baixa expressão da integrina $\alpha_2\beta_1$, e à expressão de outras integrinas as quais estão associadas à progressão tumoral. Outras integrinas associadas à progressão tumoral em câncer de mama são $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, estas são integrinas que contribuem no controle da expressão do receptor TGF- β . A expressão de $\alpha_V\beta_3$ é importante na produção e liberação de MMP-3 e 9, envolvida na migração e formação de metástase óssea, enquanto $\alpha_6\beta_4$ incrementa o tamanho do tumor e está envolvida na diminuição da sobrevida (DESGROSELLIER; CHERESH, 2010).

Nas linhagens A431 de células de carcinoma espinocelular e MDA-MB468 de mama, a liberação do fator de crescimento epidérmico (EGF) induz a progressão do ciclo celular e modificações morfológicas, como o arredondamento celular. Esta observação sugere que as vias dependentes de fatores de crescimento, podem causar perturbações no citoesqueleto, capazes de induzir morte por anoikis (FRISCH; FRANCIS, 2001). Este fenômeno proporcionaria uma forte pressão seletiva e imediata para que as células se tornem resistentes a anoikis, talvez por ativação de oncogenes. Além disso, pode explicar porque vários oncogenes simultaneamente ativam vias de sobrevivência. Estes exemplos específicos também sublinham a importância da ligação da integrina ao fator de crescimento, e a resposta celular de sobrevivência ou morte programada (FRISCH; FRANCIS, 1994; MEREDITH; FAZELI; SCHWARTZ, 1993). Este fato corrobora com os resultados obtidos em célula T47D e MCF7 tratadas com altas concentrações de jararagina. As células T47D são resistentes aos efeitos do TGF- β , enquanto as células MCF7 são sensíveis, sendo que ambas as linhagens são receptor de estrogênio positivo (KENNY et al., 2007).

As células do tumor ascítico de Ehrlich, mostraram sensibilidade intermediária entre os fibroblastos normais e as células tumorais humanas, provavelmente pela sua natureza de crescimento em suspensão, que sofreram em maior grau dano em sua membrana celular pela exposição à atividade catalítica da jararagina quando tratadas em altas concentrações. A expressão de receptores integrina tipo $\alpha_3\beta_1$ na membrana das células de Ehrlich, atua como um sistema transportador de membrana dependente de cálcio (MCCORMICK; JOHNSTONE, 1995).

Estudos em células do tumor ascítico de Ehrlich mostraram que a perda do espriamento das células de Ehrlich pode ser atribuída à perda funcional dos receptores da superfície celular responsáveis pela da adesão e espriamento, mas não há defeitos na função e organização intracelular, já que a maquinaria intracelular é preservada e pode ser ativada pela incorporação de moléculas de adesão artificiais na membrana plasmática (BOGDANOV et al., 1991).

A adesão celular e mobilidade são funções tanto de células normais e células tumorais metastáticas, envolvendo receptores de adesão transmembrana e moléculas de sinalização intracelular. Os resultados obtidos *in vitro* mostram que as células tratadas com a jararagina apresentam alterações na morfologia, como a perda da aderência à superfície com formação de agregados multicelulares tempo/concentração dependentes. Relatos similares foram descritos em células de melanoma humano (KLEIN, 2011; CORRÊA et al., 2002), células endoteliais (TANJONI et al., 2005; MOURA-DA-SILVA et al., 2001), e fibroblastos (KLEIN et al., 2011; ZIGRINO et al., 2002).

Nosso grupo demonstrou que em células de melanoma humano SKMEL-28, o tratamento com jararagina promove alterações morfológicas como retração citoplasmática, perda da adesão, e a formação de grandes agregados multicelulares; estas modificações foram acompanhados da diminuição da expressão dos genes CDK2 e CDK4, promovendo o aumento da população de células na fase S do ciclo celular (CORRÊA et al., 2002).

Em células endoteliais, a jararagina induz mudanças na dinâmica do citoesqueleto, com retração celular, acompanhada de rearranjo da rede de actina, e diminuição dos contatos de adesão focal, resultando em apoptose e ativação da pro-caspase-3 e alterações de Bax/Bcl-xL, sugerindo que estes efeitos são completamente dependentes da atividade catalítica da jararagina (TANJONI et al., 2005).

O tratamento, em doses baixas de jararagina (75 e 150 nM), não apresentou alterações morfológicas visíveis, sendo a viabilidade superior a 62% nas células de fibroblastos, 75 % em células de TAE, e maior de 80% nas células HUVEC, T47D e MCF7. Em concentrações de 300 a 1200 nM, a jararagina induz diminuição significativa da viabilidade celular com perda de adesão ao substrato, induzindo perda dos contatos de adesão focal, formação de agregados multicelulares e morte por apoptose e necrose como apresentado nos resultados de anexina V/PI. Estas alterações estão relacionadas com a estimulação da migração e a fosforilação das quinases de adesão focal, associado com a sinalização das integrinas, eventos acompanhados do rearranjo do citoesqueleto de actina, com aumento da polimerização de actina e formação de processos celulares associados a mobilidade, como os filopodios e lamelipodios (COSTA et al., 2008). Em altas concentrações (2400-4800 nM), a jararagina induz morte por necrose nas linhagens avaliadas, decorrente da atividade proteolítica do domínio catalítico e perda significativa da adesão.

Neste estudo, células de tumor T47D apresentaram resistência à toxicidade com aumento da proliferação celular e aderência, observada após tratamento das células com jararagina em concentrações menores ao IC₅₀. Outra forma de resistência à toxina, observada após tratamento das células MCF-7, deu-se em forma de estruturas agregadas tipo esferoides. Estas estruturas são formadas pela modificação no citoesqueleto de actina em resposta ao microambiente, que pode apresentar estresse físico ou químico, e é capaz de ativar a movimentação do citoesqueleto, e a formação destes esferóides (KENNY et al., 2007).

Por outro lado, o método de exclusão do azul de tripan permitiu uma melhor visualização da morfologia dos agregados celulares induzidos pelo tratamento. Os fibroblastos FN1, L929 e endoteliais HUVEC, mostraram a formação de agregados celulares com morfologia tipo cacho de uva. A célula de tumor de mama T47D mostrou formação de colônias similares ao tipo cacho de uva, mas com fraca adesão célula-célula, observando-se células totalmente isoladas e viáveis após o azul de tripan, que voltaram a aderir se à superfície da cultura após 48 e 72 horas; concentrações altas de jararagina inibiram por completo a aderência e diminuíram a viabilidade celular. Estas morfologias também foram descritas em células de tumor de mama cultivadas em microambiente 3D, sugerindo que a morfologia influi no perfil de expressão de genes e expressão de proteínas (KENNY et al. 2007).

A avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de Tripán mostrou maior porcentagem de células viáveis em comparação ao método MTT. Esta diferença pode estar relacionada no fundamento de cada teste, o MTT é um método quantitativo, indicador da atividade metabólica mitocondrial, com uma relação linear entre atividade celular e absorvância, enquanto o método de exclusão do azul de tripan é um método qualitativo, baseado no princípio que as células vivas apresentam membrana celular intacta, excluindo o corante. A perda da integridade da membrana acontece, frequentemente, após de completar a apoptose na maioria de sistemas celulares. Assim, o tratamento com a jararagina induziu perda da aderência com a MEC e diminuição da atividade mitocondrial, o que leva a um processo de morte por apoptose, como mostrado nos outros resultados, com diminuição da atividade mitocondrial e posterior perda da permeabilidade da membrana celular e viabilidade. Estes eventos foram acompanhados pela liberação do citocromo c, e alteração no ciclo celular.

As células de TEA não mostraram formação de agregados multicelulares, provavelmente pela sua natureza de crescimento em suspensão, observando-se células vivas e mortas isoladas, com fragmentação da membrana celular.

Contrariamente as outras linhagens, as células MCF7 tratadas com jararagina formaram agregados celulares tipo esferoides. As alterações observadas nestas células permitiram que fossem classificadas como massa de células com núcleo desorganizado, com fortes junções célula-célula, e ausência de lúmen (KENNY et al., 2007). Os esferoides apresentaram fortes junções celulares e células mortas nas porções medular e cortical após o tratamento com jararagina. Em cultura com maior área, a jararagina induziu a formação de túbulos visíveis sem a formação de lúmen macroscopicamente.

A avaliação pelo método de exclusão do azul de tripan permitiu também, a observação de vacúolos citoplasmáticos e corpos apoptóticos nas linhagens celulares avaliadas, com exceção das células MCF-7. Os vacúolos citoplasmáticos são produto da intensa atividade celular, acompanhado pelo aumento das células na fase S do ciclo celular, após tratamento com jararagina nas concentrações de 600 e 2400 nM.

Os resultados do IC₅₀, as alterações morfológicas e a viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de tripan em conjunto, sugerem o uso da jararagina como um agente antitumoral capaz de induzir morte celular. Entretanto, a sua

toxicidade em células normais, deverão ser avaliadas e redirecionadas a outros estudos, como por exemplo, formulação lipossomais ou vesículas que inibam seus efeitos colaterais.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são constantemente produzidas nas células como subprodutos do metabolismo celular, realizando importantes funções como mediadores de mecanismos de proteção, tais como reações apoptose, fagocitose e desintoxicação (LI et al., 2001; SALGANIK et al., 2001). O aumento excessivo da formação de ROS induz danos ao DNA, promovendo modificações mutagênicas em nucleotídeos, oxidação de proteínas e a peroxidação lipídica, desempenhando um importante papel na carcinogênese. A peroxidação lipídica, induzida pelos radicais livres, é considerada como o processo mais amplamente investigado, sendo a membrana celular um dos componentes mais atingidos pela alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados suscetíveis à peroxidação (SODERGREN, 2000). Os oxidantes em geral produzem modificações em proteínas levando à perda da função e aumentando a taxa de degradação das proteínas oxidadas, promovendo alterações na sua estrutura e na permeabilidade, o que leva à inibição do crescimento e morte celular (CERUTTI, 1994). A peroxidação lipídica pode desencadear o processo de apoptose, ativando a via intrínseca da apoptose presente em todas as células, dependente ou não da fosforilação da via das caspases (SODERGREN, 2000).

Neste trabalho, foi avaliada a produção de MDA como marcador de dano oxidativo celular da membrana lipídica. Os resultados indicam que a jararagina afeta o processo de peroxidação lipídica, em todas as linhagens celulares de maneira concentração-dependente, acompanhado pela citotoxicidade celular e alterações na morfologia. Cabe ressaltar que os níveis elevados de produção de MDA nas células de TEA tratadas com 600 – 4800 nM por 24 horas, diminuíram ao longo do tempo de tratamento, provavelmente pela diminuição da viabilidade e o aumento dos danos às membranas celulares. As linhagens tumorais humanas MCF-7 e T47D mostraram aumento significativo dos níveis de MDA a partir das concentrações de 600 nM. No entanto, não podemos excluir que as concentrações diferentes da toxina podem ter um efeito protetor contra as agressões à membrana celular.

As ROS produzidas pelas células são os principais segundos mensageiros para os sinais de sobrevivência induzidas pelo contacto MEC-célula, gerando

sinalizações dependentes de aderência pela ligação a proteínas adaptadoras e kinases (GIANCOTTI, 2000).

O tratamento com jararagina nas concentrações 600 e 2400 nM mostraram alterações no perfil do ciclo celular, indução de morte celular e alteração nos níveis de expressão de marcadores por citometria de fluxo.

Nas células T47D, FN1, L929, HUVEC e TEA foi observado o aumento na proporção de células na fase de síntese, e diminuição na fase G0/G1 em ambas as concentrações de tratamento. As alterações no citoesqueleto com perda da morfologia e adesão, em combinação com o aumento da liberação do citocromo c, caspase 3, e diminuição da expressão de Bcl 2, em diferentes proporções, sugere morte por anoikis via intrínseca em células normais. No processo de Anoikis parcialmente, há um desprendimento das células na MEC o que sensibiliza as células à apoptose mediado por Fas que ativa a cascata de caspases (FRISCH; SCREATON, 2001)

Como observado nos experimentos de lipoperoxidação, as células estiveram expostas a altos níveis de ROS, os que promovem a liberação do citocromo-c pelas mitocôndrias. O tratamento com jararagina induz o aumento da permeabilidade mitocondrial com transição e liberação do citocromo-c em todas as linhagens celulares normais, indicando dano mitocondrial.

Na célula MCF7 o tratamento com jararagina induz parada no ciclo celular com aumento da fase G0/G1 e diminuição da fase S, sendo mais acentuada na concentração de 600 nM.

Nas células de tumor ascítico de Ehrlich, a jararagina aumentou a frequência de células em fase S e aumento de G2/M, indicando uma parada no ciclo celular. A avaliação das vias de morte celular mostrou alta porcentagem de morte por apoptose e necrose em baixa concentração. Por outro lado, o aumento da expressão de TNFR1, caspase 3 clivada, liberação do citocromo c, e diminuição de Bcl 2, sugerem ativação da via intrínseca da apoptose. Este modelo celular mostrou-se altamente sensível, com morte por apoptose e necrose.

Cabe ressaltar que todas as linhagens apresentaram células em sub-G1 quando tratadas com altas concentrações de jararagina. O aumento na proporção de células em sub-G1 em células normais, caracterizadas por necrose, correlacionou-se aos dados do IC₅₀.

A avaliação da expressão de marcadores mostrou aumento de Bcl 2 em ambas as linhagens tumorais de mama humana, provavelmente responsável pela viabilidade celular e modificações no citoesqueleto, já que o aumento desta proteína induz uma anormal polimerização dos filamentos de actina localizados nas membrana celular, com remodelação do citoesqueleto e consequente diminuição do espriamento celular (KE et al., 2010). Nas células MCF7 não foi observada a expressão significativa de caspase 3 clivada, nem na expressão do receptor, TNFR1, mas, há liberação de citocromo c no tratamento a 2400 nM, sugerindo morte celular por apoptose via intrínseca independente de caspase 3. Por outro lado, em células T47D, a jararagina induziu aumento de caspase 3 clivada, liberação do citocromo c, e expressão de Bcl 2 e TNFR1 em altas concentrações, sugerindo proporção de células mortas por apoptose via extrínseca.

A proporção de células viáveis encontradas na avaliação por anexina V/PI, após o tratamento com jararagina nas células tumorais de mama humana, não mostraram diferenças entre os grupos tratados e controle, provavelmente associada à sinalização e transdução dos sinais de sobrevivência que permitem às células neutralizar estímulos apoptóticos e escapar da morte celular, a sua vez a superexpressão de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL está correlacionada com o aumento da resistência ao TNF-a.

Além da morte por apoptose, a linhagem tumoral MCF7 mostrou a formação de estruturas tipo esferóides, perda da adesão celular, remodelação do citoesqueleto, e a formação de agregados celulares semelhantes aos acinos e estruturas ductais. Este é um mecanismo cito protetor utilizado por células epiteliais, como uma estratégia de sobrevivência a anoikis em condições de estresse ou falta de nutrientes com perda de adesão à MEC, induzindo a morte por autofagia (DEBNATH et al., 2008; OUYANG et al., 2012) ou entosis (OVERHOLTZER et al., 2007).

No processo de formação de lúmen em cultura de células mamárias, ocorre uma seleção de células resistentes ao processo de anoikis, com formação de esferóides e uma gradativa diminuição do número de células da região medular (SIMPSON; ANYIWE; SCHIMMER, 2008). O crescimento de esferóides é o resultado da agregação, proliferação, polarização, modulação das moléculas de adesão, e a morte das células do lúmen (DO AMARAL; URABAYASHI; MACHADO-SANTELLI, 2010). O balanço dinâmico entre proliferação e morte celular explicam os tipos de morte responsáveis pela formação do lúmen, podendo ser por apoptose,

autofagia ou entose. A autofagia é um processo que ocorre em resposta a um estresse metabólico que resulta na degradação de componentes celulares (DEBNATH et al., 2008), a entosis é um tipo de morte celular ativada por reações catabólicas, caracterizadas pela interiorização de uma célula viva pela célula vizinha, descrita como canibalismo celular. A decisão se a célula interiorizada vai viver o morrer por degradação lisosomal, é dependente das condições do médio externo (GUADAMILLAS; CEREZO; DEL POZO, 2011

As células tumorais MCF-7 são descritas como as mais eficientes em realizar morte por entosis, por apresentar perda de caspase 3 e beclina 1, e por tanto, são relativamente incompetentes para apoptosis e autofagia (OVERHOLTZER et al., 2007).

A morte celular por entose na linhagem MCF-7 tem sido associada com perda da aderência à MEC. O aumento das forças de tensão endógena e exógena, dos filamentos do citoesqueleto, há a ativação de vias mecano-regulatorias que levam a estabilizar a adesão focal (PASZEK et al., 2005). Nossos resultados sugerem que as células de mama MCF7, tratadas com jararagina, podem sofrer morte celular por entoses, mas precisa ser avaliado.

A morte por apoptose via anoikis, pode ser provocada por moléculas que degradam a MEC, como as metaproteinases, interferindo com a formação de complexos citoesqueleto e membrana conhecidos como adesão focal. Domínios tipo desintegrina isolados de SVMPs III, tem mostrado indução de apoptose (YOU et al., 2003). Nas SVMPs, a combinação de mecanismos como a catálise de adesões focais pelo domínio metaloproteinase, e a transdução de sinais mediadas pelo domínio tipo desintegrina são os possíveis estimuladores da morte por anoikis. No tratamento com jararagina, a perda da adesão focal, é possivelmente o principal indutor de apoptosis via anoikis, entretanto outros mecanismos deverão ser elucidados dependendo do tipo celular (TANJONI et al., 2005).

A somatória dos valores de IC_{50} , as alterações morfológicas e a viabilidade celular em conjunto, sugerem o possível uso da jararagina como um agente antitumoral capaz de induzir morte celular. Entretanto, a sua toxicidade em células normais, deverão ser avaliadas e redirecionadas a outros estudos, como por exemplo, formulação liposomais ou vesículas que modulem os efeitos colaterais.

Baseados nos experimentos *in vitro*, foram estudados os efeitos do tratamento com jararagina em animais portadores de adenocarcinoma murino de Ehrlich, nas formas ascítica e sólida - modelo ortotópico. O tratamento diário com a jararagina nas concentrações de 400 e 800 nM, dia após a inoculação das células tumorais permitiu avaliar a influencia do tratamento no desenvolvimento do tumor, na progressão metastática, angiogênese ou inibição da doença.

Embora as células do tumor ascítico de Ehrlich mostraram os maiores efeitos de citotoxicidade *in vitro*, os grupos de tratamento *in vivo* com jararagina no modelo de tumor ascítico (TEA) não apresentaram diferenças significativas no volume do tumor, nem a taxa de sobrevivência global, quando comparadas ao grupo controle. Apesar de não apresentar diferenças matemáticas do volume ascítico, foi observado aumento significativo no peso corporal do grupo tratado com jararagina 800 nM a partir do 13º dia de tratamento, isto pode ser atribuído a atividade pró-inflamatória da jararagina que induziu aumento do volume e no ganho do peso.

Em tumores ascíticos, uma camada de estroma tumoral é formada nos tecidos peritoneais de revestimento (peritônio, mesentério e diafragma), desenvolvendo-se um estroma altamente vascularizado, com peritônio rico em vasos sanguíneos e capilares sanguíneos, que permitem o transporte de oxigênio e de nutrientes essenciais para o crescimento tumoral e formação de metástase (TEIXEIRA et al., 2006).

Estudos *in vitro* têm mostrado que o tratamento com jararagina 50 µg/mL (1000 nM), em células aderentes residentes na cavidade peritoneal de camundongos, induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias como o TNF-alfa, IL-1b, e IL-6, citocinas que são facilmente degradadas pela ação proteolítica da própria toxina (CLISSA et al., 2001).

Neste microambiente ascítico e considerando a resposta das células residentes, o tratamento com jararagina estimula a resposta inflamatória. Os componentes principais do líquido ascítico são as células tumorais, células inflamatórias e células mesoteliais, cujos derivados como fatores de crescimento e de citocinas estão em suspensão e, apresentam influência direta ou indireta no desenvolvimento do tumor. Este processo leva à liberação de fluidos na cavidade abdominal, o que no modelo experimental ascítico não representa uma ferramenta adequada para a avaliação dos efeitos antitumorais.

Neste contexto, as respostas *in vitro* e *in vivo* no mesmo tipo celular diferem pelo microambiente tumoral, que favorece o crescimento celular e a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células residentes no peritônio. Assim, a baixa viabilidade observada como resposta a jararagina no tratamento *in vitro*, não foi reproduzida no modelo *in vivo*. Considerando, a atividade inflamatória e proteolítica, a dose diária de 400 nM de jararagina pode ter influenciado no aumento de fatores estimulantes de inflamação, assim como a degradação da membrana basal da microvasculatura, e a presença de micro-hemorragias na concentração de 800 nM.

A avaliação da população de células tumorais do líquido ascítico, após 7 e 14 dias, mostrou aumento significativo da população R1 nos grupos tratados com jararagina, onde são detectados duas subpopulações, células tumorais e provavelmente células do infiltrado inflamatório ou debris celular. A avaliação do ciclo celular mostrou aumento significativo das fases G0/G1 e S, em todos os grupos tratados com jararagina, esta diminuição na progressão do ciclo celular e a diminuição da atividade mitocondrial, são descritas como produto da desaceleração no crescimento das células tumorais como consequência do microambiente anóxico (TANNOCK, 1969).

O efeito direto da jararagina no dano da membrana das células tumorais pode levar ao aumento da proliferação celular *in vivo*, segundo resultados mostrados por Donenko em células tumorais de Ehrlich (1992). O extrato da lise das células tumorais de Ehrlich mostrou efeito protetor *in vivo* com aumento na proliferação de outras células tumorais (DONENKO, 1992). Assim, a divergência da sensibilidade das células de tumor de Ehrlich *in vitro* e *in vivo*, estaria relacionada ao microambiente tumoral *in vivo*, onde as células secretam fatores que aumentam a permeabilidade vascular e presença de fatores que promovem a proliferação no líquido ascítico.

Entretanto, a viabilidade das células tumorais nos grupos tratados com jararagina é significativamente menor quando comparada ao controle; portanto, poderia ser uma eficácia de resposta antitumoral, demonstrando os efeitos antitumorais da jararagina, como já publicado por nosso grupo. No entanto, a indução de morte e proliferação celular, exercida pela jararagina, favorece a proliferação celular pela liberação de citocinas próprias do processo inflamatório.

Durante o processo inflamatório, os leucócitos são os efetores celulares primários que se mobilizam até o local da inflamação com a finalidade de ingerir,

matar ou neutralizar o agente agressor, pela liberação de produtos tóxicos, incluindo enzimas proteolíticas, intermediários reativos de oxigênio, e proteínas catiônicas. Estes intermediários reativos de oxigênio são gerados em reações na cadeia transportadora da mitocôndria, que podem atuar como reguladores nas vias de sinalização. A jararagina aumenta a produção de malondialdeído de maneira dose dependente no TEA, produzido em parte pelas células inflamatórias, e pelas células tumorais.

As avaliações do infiltrado celular inflamatório mostraram que animais portadores do TEA, tratados com o veneno bruto de *B. jararaca*, não apresentaram diferenças na quantidade de leucócitos na cavidade peritoneal em comparação ao grupo controle (SILVA et al., 2002), pelo que a inibição do crescimento tumoral pode estar relacionada ao efeito proteolítico do veneno sobre as células tumorais ou sobre os mediadores, que modulam o crescimento tumoral (DE VIEIRA SANTOS et al., 2004).

Nas análises do líquido ascítico nota-se a presença de células tumorais exibindo extenso pleomorfismo, alteração da relação núcleo/citoplasma, e presença de infiltrado inflamatório. O tratamento com jararagina mostrou o aumento de infiltrado inflamatório, com ninho de neutrófilos, e *blebbing* na membrana das células tumorais, assim como condensação da cromatina, sugerindo a atividade proteolítica e inflamatória da toxina, e conseqüentemente, a produção de radicais livres peroxidados e morte por apoptose, que foram discutidos anteriormente.

O tratamento com a jararagina 400 e 800 nM induz infiltrado inflamatório, o qual é caracterizado por aumento de líquido, diminuição da viabilidade das células tumorais e o aumento na expressão de marcadores de inflamação.

A avaliação da expressão de receptores de superfície celular mostrou diminuição da IL6R, assim como o aumento de CD44 e CD34 nos grupos tratados com jararagina. Não houve variações nos valores de IL1R, e expressão do receptor VEGFR1 nos grupos tratados com jararagina em comparação ao grupo controle. O aumento de CD44 pode estar envolvido com o aumento da resposta inflamatória, por ser uma molécula de adesão expressa em linfócitos B e T, enquanto que o CD34 indica a presença de células precursoras hematopoiéticas e endoteliais, sugerindo intensa vascularização e doença mieloproliferativa como observado no TES.

A injeção intraperitoneal com doses baixas de jararagina (6-48 ng) mostrou um grande aumento de mastócitos, mostrando que a jararagina possui um efeito

seletivo proliferativo ou provoca o recrutamento dessas células. Preparações citológicas das células residentes da cavidade peritoneal mostraram que os mastócitos apresentam grânulos em seu citoplasma, indicando que concentrações baixas não induzem a degranulação ou a liberação de aminas vasoativas, como histaminas ou outros mediadores inflamatórios. A jararagina induz aumento na produção e diferenciação de mieloblastos em concentrações acima de 48 ng, sugerindo que a toxina induz efeitos tóxicos na maturação e liberação de leucócitos na circulação (MARIA, VASSÃO; RUIZ, 2003). Nossos resultados do tratamento diário em doses de 400 e 800 nM, mostraram os efeitos da jararagina na liberação de precursores mieloides, como CD34 e reticulócitos, e sua modulação no crescimento tumoral.

As células imunes tipo leucócitos e da linhagem mielóide, como mastócitos, macrófagos, monócitos e neutrófilos, tem induzido a progressão do tumor, por exercer numerosas atividades pro tumorais, como estimulação de angiogênese, supressão de atividade antitumoral, e aumento da migração celular e metástase, por sua vez estão associados aos fibroblastos que se tornam ativados, pelo qual o papel das células mieloides é motivo de controvérsia no câncer de mama. (BISSELL; HINES, 2011; COUSSENS; POLLARD, 2011). Outros tipos celulares, como plaquetas, eosinófilos e progenitores hematopoiéticos, mas ainda não foram determinados como promotores diretos da angiogênese tumoral, considerando as diversas funções na inflamação e remodelação tecidual (COUSSENS; POLLARD, 2011).

Clissa e colaboradores (2001) mostram o aumento de citocinas pró-inflamatórias IL-1b, IL-6 e TNFa em cultura de macrófagos após tratamento com jararagina. Neste estudo, embora não tenha sido detectada variação nos níveis de expressão do receptor IL-1R *in vivo*, não se descarta a presença desta citocina no peritônio, contribuindo para uma resposta inflamatória sistêmica. Por outro lado, a diminuição dos níveis de expressão de IL-6R, mostra que a jararagina induz outras vias de estimulação da proliferação. A interleucina-6 é um fator de crescimento epitelial autócrino e parácrino em vários tipos tumorais, inclusive o de mama, estimula o crescimento de células tumorais e contribui para recorrência e metástases de câncer de mama (RAO et al., 2006).

A IL1 é uma citocina mediadora de inflamação que induz a expressão de moléculas de adesão, como CD44 e CD34 e liberação de mediadores da quimiotaxia

de leucócitos (BORISH et al., 1990). O CD44 é uma glicoproteína transmembrana amplamente distribuída em vários tipos células normais e tumorais, que desempenha um papel crítico na adesão, migração, invasão e sobrevivência celular.

Okamoto et al. (2002) demonstraram aumento dos níveis de CD44 solúvel no plasma de pacientes com tumores, refletindo o aumento das atividades proteolíticas e remodelamento da matriz associada ao crescimento e metástase. Uma das funções da molécula CD44 é a ativação de linfócitos T (LOOI et al., 2006). Na resposta inflamatória, o CD44 inicia a ativação dos linfócitos T para saída dos vasos para os vários tecidos inflamados (SIEGELMAN; STANESCU; ESTESS, 2000).

A análise dos esfregaços do fluido ascítico e sanguíneo mostraram a presença de abundante infiltrado inflamatório nos grupos tratados com jararagina, correlacionando com o aumento nos valores de expressão de das moléculas dos marcadores de adesão CD44 e CD34. A estimulação de uma resposta inflamatória, induzida pela jararagina, influencia no aumento dos linfonodos inguinais e retroperitoneais.

O aumento na expressão do CD34 no fluido ascítico dos animais tratados com jararagina pode ser devido a capacidade de indução de proliferação de precursores hematopóieticos, que geram respostas locais, como a presença do infiltrado inflamatório, e sistemicamente podem causar aumento de órgãos como o baço, fígado e gânglios linfáticos, como observado no modelo ortotópico.

Entretanto, as citocinas e a produção de ROS podem ter sido consequência do dano induzido no tecido, como hemorragia e necrose. Estes mediadores provavelmente se associam com outras vias de sinalização e promovem diversas alterações fisiopatológicas e danos tissulares.

Experimentos realizados mostraram que a jararagina é uma potente toxina pró-inflamatória e hemorrágica dependendo da dose, na concentração de 1,25 µg a jararagina induz acumulação de neutrófilos na bolha de ar, enquanto que 5 µg de jararagina induz hemorragia quando injetada no coxim plantar (COSTA et al., 2002). No presente trabalho, a jararagina foi administrada na dose de 1 µg (400 nM) e 2 µg (800 nM), sendo a primeira dose não inflamatória e a segunda uma dose não hemorrágica, segunda a bibliografia.

O tumor de Ehrlich sólido (TES) ortotópico é um modelo experimental importante na avaliação do crescimento local *in situ* do tumor sólido que proporciona uma vantagem sobre o modelo ascítico, pois há um microambiente definido,

mostrando aspectos funcionais e estruturais distintos em resposta ao tratamento. Os tumores sólidos são estruturas tipo órgãos, heterogêneos e complexos estruturalmente, com células tumorais e estromais. Comparado com o tecido normal, o estroma do tumor está associado com uma MEC alterada e um aumento no número de fibroblastos que sintetizam fatores de crescimento, citocinas, e moléculas de adesão. Assim, o estroma apresenta uma importante função na capacidade de invasão tumoral e metástase.

Na avaliação da progressão do tumor, o tratamento com jararagina no modelo experimental TES mostrou aumento significativo do volume do tumor, linfonodos e órgãos nos grupos tratados com jararagina. Macroscopicamente, os tumores tratados com jararagina apresentaram edema, hiperemia, hemorragia subcutânea e ulcerações, característicos de uma lesão tecidual, acompanhado de linfadenopatia em gânglio linfático drenante induzido pela resposta imune. Considerando que a jararagina é uma metaloprotease tipo hemorrágica, neste tratamento induziu uma resposta inflamatória intratumoral, resultando em um aumento de irrigação sanguínea e remodelação tecidual.

Além da resposta inflamatória, ocorre a formação de áreas de necroses e ulceração. Assim, a proteólise e remodelação da rede da MEC, regula a tensão no tecido, gerando vias para a migração e liberação de fragmentos proteicos da MEC.

Os fibroblastos são as principais células de remodelação da MEC, produzindo colágeno e secretando fatores de crescimento. Por outro lado, o microambiente com intensa remodelação, produz fibras de colágeno imaturas, do tipo fibrose que faz pressão sobre o microambiente tumoral, e induz a saída de células com formação de metástase. Provavelmente, este foi o mecanismo pelo qual foram encontradas células tumorais no sangue.

A aneuploidia é um forte indicador de malignidade, embora haja um número significativo de neoplasias malignas de padrão diploide. Pinto et al. (2003) estudaram a expressão dos receptores hormonais e ploidia por citometria de fluxo, e seus dados indicaram que os receptores para progesterona e ploidia de DNA são fatores prognósticos independentes no desenvolvimento do carcinoma de mama.

Neste estudo, foram avaliados isoladamente as porções medular e periférica dos tumores sólidos, a justificativa decorre do aspecto morfológico apresentado, fato da estratificação das camadas celulares, organização, densidade e estroma sintetizado no tumor. A análise de ploidia celular da massa tumoral mostrou menor

proporção do número de células aneuplóides, com aumento na proporção do número de células diploides, o que indica que o volume maior observado nos grupos tratados, é decorrente da remodelação tecidual e infiltrado inflamatório.

Neste trabalho, foram encontrados efeitos antiproliferativos na porção medular, com diminuição da proporção células na fase G0/G1 e na porção cortical há uma parada das células na fase G2/M e aumento de células em G0/G1, supostamente quiescentes.

A avaliação do potencial da membrana mitocondrial nos tumores mostrou alto potencial mitocondrial nos tumores sólidos, sem diferenças entre os grupos, no entanto observou-se baixo potencial mitocondrial nas células do TEA. Estes resultados estão correlacionados com a intensa atividade celular induzida pela inflamação, remodelação tecidual e angiogênese no TES, em contraparte foi observado diminuição da viabilidade celular Nas células do TEA.

Arquitetura, integridade e a função do tecido estão intimamente ligadas pelas interações célula-célula e célula-MEC. A remodelação do tecido através da ação de proteinases (MMPs), maquinaria apoptótica, assim como, fatores de crescimento e moléculas de sinalização, como consequência da inflamação e do remodelamento tecidual, induzem a formação de fibras de colágeno, fibras elásticas, infiltrado inflamatório, promovendo uma matriz densa que exerce um controle sobre o microambiente. Os compartimentos da matriz refletem uma distribuição das células tumorais, das células inflamatórias e dos fibroblastos residente e os recrutados pelo estroma, importantes na remodelação da MEC. A integridade da membrana basal é determinada tanto pela síntese de novos componentes pelo epitélio, como pelo estroma, e os efeitos sistêmicos.

No presente experimento, foi detectado a presença de células metastáticas no grupo jararagina 400 nM, como também o maior volume tumoral, presença de ulcerações e o aumento nos órgãos baço e fígado, provavelmente como consequência do estroma denso, e as alterações hematológicas. No entanto, o aumento da densidade da MEC pode ter atuado criando um isolamento do tumor. Na avaliação sanguínea, após 49 dias de tratamento foi observado a presença de células tumorais na via hematogênica acompanhada do aumento de plaquetas, no grupo tratado com jararagina 400 nM. Uma hipótese para explicar a metástase é que o tratamento local diário com jararagina modificou o microambiente tumoral, induzindo uma resposta inflamatória, remodelação tecidual e angiogênese,

proporcionando a via de escape para a corrente sanguínea nas células tumorais, evento não observado no grupo controle.

A ação inflamatória da jararagina, com recrutamento de células polimorfonucleares e mononucleares, com predominância de neutrófilos, é um mecanismo parcialmente dependente do domínio catalítico da jararagina, que ocorre na presença de macrófagos (COSTA et al., 2002). No câncer de mama, os macrófagos são um dos tipos celulares relacionados com angiogênese, pela liberação de fatores pro angiogênicos como VEGF e proteases, favorecendo a angiogênese dos vasos e do tumor (COUSSEN et al., 2011).

Estudos em células tumorais têm mostrado a associação entre inflamação e angiogênese no crescimento celular e invasão (BIERIE et al., 2009; COUSSENS et al., 1999). O estado reticulado do colágeno e rigidez da MEC, dois parâmetros físicos do microambiente do tecido, modulam o comportamento invasivo. Os tumores de mama rígidos ou endurecidos forçam as adesões focais promovendo a invasão da MEC e inibindo a sinalização de adesões focais e invasão tumoral. Nos grupos tratados com a jararagina, os resultados demonstraram uma massa tumoral densa, com aumento da população celular na região medular do tumor e áreas de fibrose, e metástase na corrente sanguínea, sem a formação de massas nodulares nos órgãos internos.

A jararagina alterou os padrões de hematológicos, sistêmicos, sendo capaz de induzir anemia e leucopenia, porém em menor proporção que outros tratamentos como a quimioterapia e radioterapia.

A análise histopatológica dos tumores tratados com jararagina mostrou aumento das áreas de necrose na porção medular do tumor, com áreas de hiperproliferação e fibrose. A necrose pode estar associada à hipóxia celular ocasionada pelo edema e o aumento da MEC, como o aumento da população celular R1. O tratamento de animais portadores de tumores ortotópicos com jararagina apresentaram aumento no baço, fígado e gânglios linfáticos drenantes ao sítio de implantação das células tumorais. Destaca-se a hepatoesplenomegalia e a linfadenopatia, nos grupos tratados, provavelmente associados ao tratamento crônico e a exacerbação da resposta inflamatória.

O baço é um órgão com função hematopoiética no camundongo, e influi na composição do sangue, e funciona como dois órgãos, fazendo parte do sistema de defesa e removendo debris ou restos celulares da circulação. Os resultados obtidos

no modelo ortotópico, tratados com jararagina por 49 dias, mostram esplenomegalia sem redução no número de leucócitos e plaquetas circulantes, com um aumento significativo, com desvio à esquerda (aumento de reticulócitos na circulação periférica). O baço aumentado de tamanho retém um grande número de células sanguíneas anormais, estas produzem obstruções no seu interior e interferem no seu funcionamento.

Na inflamação, alguns estágios da reação inflamatória são caracterizados por uma progressiva infiltração de tecido perivascular por diferentes subtipos de leucócitos. Os granulócitos migram no tecido afetado nos estágios iniciais da resposta inflamatória, encontrando-se aumentadas nas primeiras coletas em sangue em ambos os grupos de tratamento nos modelos TEA e TES.

As células inflamatórias e citocinas encontradas em tumores, por muito tempo foram vistas como mecanismos de defesa anti-tumor, registros na literatura têm mostrado seu papel no crescimento, progressão e imunossupressão das neoplasias (ALLAVENA et al., 2008; MANTOVANI et al., 2008). Por outro lado, a inflamação persistente parece criar um microambiente favorável para o crescimento e progressão tumoral, e as células estromais derivadas de nódulos linfáticos podem aumentar a proliferação de células do tumor por meio da libertação de fator de crescimento tipo insulina e fator de crescimento epidérmico (ZHANG; NIE; CHAKRABARTY, 2011).

O tratamento com jararagina induz infiltração de células do tipo mastócitos que se apresentaram nas preparações citológicas, como células íntegras e degranuladas, em todas as concentrações e períodos analisados. Camundongos C57BL/6J tratados com jararagina cronicamente por 9 semanas, administrada pela via intraperitoneal, mostraram que esta toxina possui um efeito seletivo proliferativo ou provoca o recrutamento dessas células (MARIA et al., 2003).

Mediadores de reação inflamatória parecem estar envolvidos na indução de influxo de leucócitos pela jararagina. A liberação destes mediadores responsáveis pela acumulação de leucócitos na área inflamada, como o metabolismo do ácido araquidônico.

A avaliação da resposta inflamatória e sua modulação ainda são questionadas, vários autores demonstraram que os efeitos das toxinas ofídicas atuam sobre células sanguíneas, medula óssea, músculo liso, epiderme, mostrando

resultados variáveis, dependendo da concentração, tempo de exposição, via de inoculação e tipo de toxina utilizada, como também o tecido ou local de inoculação.

A administração *in vivo* da jararagina em camundongos C57Bl/6J, mostraram que baixas concentrações de jararagina (de 6 a 48ng) no tecido subcutâneo são capazes de induzir o influxo de macrófagos no compartimento peritoneal. Portanto, baixas concentrações de jararagina, administradas agudamente ou cronicamente, são capazes de induzirem respostas inflamatórias, sem causar efeitos deletérios no sistema vascular e na microvascularização. Os efeitos crônicos da inoculação sobre a medula óssea mostraram que as maturações das células e precursores ou unidades formadoras de colônia obedeceram à dose do tratamento, em baixas doses há um aumento na produção e diferenciação de linfócitos e linfoblastos, monócitos e monoblastos e mieloblastos (MARIA et al., 2003).

Esses resultados reforçam a hipótese que a toxina induz efeitos tóxicos na maturação e liberação de leucócitos para a circulação.

Neste trabalho, os efeitos colaterais identificados no compartimento sanguíneos foram anemia, aumento de plaquetas e leucócitos, que poderiam ser decorrentes da formação hemorrágica do fluido ascítico presente na cavidade abdominal em conjunto com as células tumorais ou ainda pela produção de receptores e a liberação de fatores de crescimento estimulatórios ou inibitórios, induzidos pela toxina ao longo do tratamento.

Nesta condição, o microambiente tumoral e suas interações com outros sistemas é uma parte integral anatômica e fisiologicamente associado, pelo qual, o tratamento com jararagina foi capaz de modular o crescimento do tumor, induzindo efeitos inflamatórios que foram capazes de modificar a resposta terapêutica.

Pelos resultados, e como a sabedoria medica diz, a diferença entre o remédio e o veneno, acostuma estar na dose, assim a jararagina a 800 nM resulto toxico e induziu necroso e hemorragia, mas a 400 nM provocou uma exacerbação da resposta imunológica a alto nível, mostrando que a inflamação exacerbada pode influenciar no microambiente tumoral, pelo que doses menores deveriam ser avaliadas em trabalhos futuros.

5 CONCLUSÕES

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

REFERÊNCIAS¹

ALLAVENA, P.; GARLANDA, C.; BORRELLO, M. G.; SICA, A.; MANTOVANI, A. Pathways connecting inflammation and cancer. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 18, n. 1, p. 3-10, 2008.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2012**. Atlanta: American Cancer Society, 2012.

BALDO, C.; JAMORA, C.; YAMANOUYE, N.; ZORN, T.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and *in situ* hydrolysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, e727, 2010.

BALDO, C.; TANJONI, I.; LEÓN, I. R.; BATISTA, I. F.; DELLA-CASA, M. S.; CLISSA, P. B.; WEINLICH, R.; LOPES-FERREIRA, M.; LEBRUN, I.; AMARANTE-MENDES, G. P.; RODRIGUES, V. M.; PERALES, J.; VALENTE, R. H.; MOURA-DA-SILVA, A. M. BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 54-65, 2008.

BEACHAM, D. A.; CUKIERMAN, E. Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. **Semin. Cancer Biol.**, v. 15, n. 5, p. 329-341, 2005.

BEVIGLIA, L.; STEWART, G. J.; NIEWIAROWSKI, S. Effect of four disintegrins on the adhesive and metastatic properties of B16F10 melanoma cells in a murine model. **Oncol. Res.**, v. 7, p. 7-20, 1995.

BIERIE, B.; CHUNG, C. H.; PARKER, J. S.; STOVER, D. G.; CHENG, N.; CHYTIL, A.; AAKRE, M.; SHYR, Y.; MOSES, H. L. Abrogation of TGF-beta signaling enhances chemokine production and correlates with prognosis in human breast cancer. **J. Clin. Invest.**, v. 119, n. 6, p. 1571-1782, 2009.

BISSELL, M. J.; HINES, W. C. Why don't we get more cancer? a proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. **Nat. Med.**, v. 17, p. 320-329, 2011.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.**, v. 62, p. 325-372, 1994.

BOGDANOV, A. A.; GORDEEVA, L. V.; BAIBAKOV, B. A.; MARGOLIS, L. B.; TORCHILIN, V. P. Restoration of adhesive potentials of Ehrlich ascites carcinoma cells by modification of plasma membrane. **J. Cell Physiol.**, v. 147, n. 1, p. 182-190, 1991.

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

BORISH, L.; ROSENBAUM, R.; MCDONALD, B.; ROSENWASSER, L. J. Recombinant interleukin-1 beta interacts with high-affinity receptors to activate neutrophil leukotriene B4 synthesis. **Inflammation**, v. 14, n. 2, p. 151-162, 1990.

BOYD, N. F.; GUO, H.; MARTIN, L. J.; SUN, L.; STONE, J.; FISHELL, E.; JONG, R.; HISLOP, G.; CHIARELLI, A.; MINKIN, S.; YAFFE, M. J. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 356, n. 3, p. 227-236, 2007.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

COUSSENS, L. M.; RAYMOND, W. W. BERGERS, G.; LAIG-WEBSTER, M.; BEHRENDTSEN, O.; WERB, Z.; CAUGHEY, G. H.; HANAHAN, D. Inflammatory

mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. **Genes Dev.**, v. 13, n. 11, p. 1382-1397, 1999.

COUSSENS, L. M.; POLLARD, J. W. Leukocytes in mammary development and cancer. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 3, n. 3, p. , 2011.

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

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

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

DEBNATH, J.; MUTHUSWAMY, S. K.; BRUGGE, J. S.; Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. **Methods**, v. 30, p. 256-268, 2003.

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

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

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

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

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

EREZ, N.; TRUITT, M.; OLSON, P.; HANAHAN, D. **Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF- κ B-Dependent Manner.** *Cancer Cell*, v. 17, n. 2, p. 135-147, 2010.

ESCALANTE, T.; NÚÑEZ, J.; MOURA-DA-SILVA, A._M.; RUCAVADO, A.; THEAKSTON, R. D.; GUTIÉRREZ, J. M. Pulmonary hemorrhage induced by

jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 193, n. 1, p. 17-28, 2003.

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

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

FRASCA, F.; PANDINI, G.; SCIACCA, L.; PEZZINO, V.; SQUATRITO, S.; BELFIORE, A.; VIGNERI, R. The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases. *Arch. Physiol. Biochem.*, v. 114, p. 23 - 37, 2008.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LAMBERT, A.; OZTURK, S.; THIAGALINGAM, S. Integrin Signaling in Mammary Epithelial Cells and Breast Cancer. **Oncol.** Published online. 2012.

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

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

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

LOOI, L.M.; CHEAH, P.L.; ZHAO, W.; NG, M.H.; YIP, C.H. CD44 expression and axillary lymph node metastasis in infiltrating ductal carcinoma of the breast. **Malaysian Journal Pathology**, v. 28, n. 2, p. 83086, 2006.

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

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

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

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

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

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

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

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

MORRIS, V.L.; SCHMIDT, E.E.; KOOP, S.; MACDONALD, I.C.; GRATTAN, M.; KHOKHA, R.; MCLANE, M.A.; NIEWIAROWSKI, S.; CHAMBERS, A.F.; GROOM, A.C. Effects of the disintegrin eristostatin on individual steps of hemaogenous metastases. **Exp. Cell. Res.**, v. 219, n. 2, p. 571-578, 1995.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SICKLES, E. A. Wolfe mammographic parenchymal patterns and breast cancer risk. **AJR Am. J. Roentgenol.**, v. 188, p. 301-303, 2007.

SIEGELMAN, M. H.; STANESCU, D.; ESTESS, P. The CD44- initiated pathway of T-cell extravasation uses VLA-4 but not LFA-1 for firm adhesion. **J. Clin. Invest.**, v. 105, p. 683-691, 2000.

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

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

SODERGREN, E. **Lipid peroxidation in vivo. Evaluation and application of methods for measurement**. 2000. 78 f. Ph. D. thesis (Medical Science in Geriatrics)

- Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine, Uppsala University, Scandinavia.

SON, D. J.; PARK, M. H.; CHAE, S. J.; MOON, S.O.; LEE, J. W.; SONG, H. S.; MOON, D. C.; KANG, S. S.; KWON, Y. E.; HONG, J. T. Inhibitory effect of snake venom toxin from *Vipera lebetina turanica* on hormone-refractory human prostate cancer cell growth: induction of apoptosis through inactivation of nuclear factor κB. **Mol. Cancer Ther.**, v. 6, p. 675-683, 2007.

SONG, J. K.; JO, M. R.; PARK, M. H.; SONG, H. S.; AN, B. J.; SONG, M. J.; HAN, S. B.; HONG, J. T. Cell growth inhibition and induction of apoptosis by snake venom toxin in ovarian cancer cell via inactivation of nuclear factor κB and signal transducer and activator of transcription 3. **Arch. Pharm. Res.**, v. 35, n. 5, p. 867-876, 2012.

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

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

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

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

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

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

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

WATSON, C. J.; KHALED, W. T. Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. **Development**, v. 136, p. 995-1003, 2008.

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

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

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

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

ZHANG, X.; NIE, D.; CHAKRABARTY, S. Growth factors in tumor microenvironment. **Front Biosci.** v. 15, n. 1, p. 151-165, 2010.

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

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

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