UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

Avaliação da indução de apoptose pela desintegrina recombinante Dis*Ba*-01 em macrófagos e células tumorais

Lívia Contini Massimino

Araraquara-SP
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

Avaliação da indução de apoptose pela desintegrina recombinante Dis*Ba*-01 em macrófagos e células tumorais

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado junto ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Lívia Contini Massimino

Orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Araraquara-SP
2012

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família: meus pais, Rosana e Aparecido, e meus irmãos, Ana Carolina, Rafael e Isadora; que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando, incentivando e auxiliando durante todo o meu percurso.

AGRADECIMENTO

Agradeço a todos que colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho e contribuíram de alguma forma para que o caminho percorrido durante todo o curso fosse trilhado da melhor forma.

À minha querida orientadora, Prof. Dra. Iracilda Zeppone Carlos, que possibilitou que os objetivos desse projeto fossem atingidos.

À Doutoranda Lívia Carolina de Abreu Ribeiro, pois sem a ajuda dela este trabalho não teria acontecido da forma que aconteceu.

À Marisa Campos Polesi Placeres e amigos presentes no dia-a-dia do laboratório por todo o apoio, indispensável para a conclusão deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida, me apoiando financeiramente durante a elaboração desta pesquisa.

A todos os meus professores que, durante todo o período do curso, me ensinaram, me aconselharam e me apoiaram para que me torna-se uma pessoa mais consciente do meu papel na sociedade.

Aos meus familiares por compreenderem a importância deste projeto e os momentos em que estive ausente para o desenvolvimento desta pesquisa.

À colaboração de meus amigos, que mesmo em horas difíceis e com a distância me ajudaram a fazer um trabalho melhor e em alguns momentos compreenderem os sacrifícios que fiz para que este trabalho fosse elaborado da melhor forma possível.

“Insanidade é continuar fazendo sempre a mesma coisa e esperar resultados diferentes.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO ..... **Erro! Indicador não definido.**1

2. OBJETIVOS..... **Erro! Indicador não definido.**7

2.1. Objetivo Geral ..... **Erro! Indicador não definido.**7

2.2. Objetivos Específicos ..... **Erro! Indicador não definido.**7

3. DESENVOLVIMENTO ..... **Erro! Indicador não definido.**8

3.1. Materiais e Métodos ..... **Erro! Indicador não definido.**8

3.1.1. Obtenção da desintegrina Dis*Ba*-01.....18

3.1.2. Purificação e concentração da desintegrina Dis*Ba*-01.....19

3.1.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....20

3.1.4. Dosagem de proteínas.....20

3.1.5. Linhagens celulares.....21

3.1.6. Preparo das placas de cultura sensibilizadas.....22

3.1.7. Ensaio de citotoxicidade celular em células aderidas ou não aderidas.....22

3.1.8. Apoptose por Anexina V.....24

3.1.9. Apoptose por TUNEL.....25

3.1.10. Análise estatística.....26

3.2. Detalhamento dos Progressos Realizados ..... **Erro! Indicador não definido.**7

3.2.1. Obtenção da desintegrina Dis*Ba*-01.....27

3.2.2. Ensaio de citotoxicidade celular em células aderidas ou não aderidas.....30

3.2.3. Apoptose em células aderidas e não aderidas.....34

4. CONCLUSÃO 39

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....40

RESUMO

O câncer é causado pela proliferação descontrolada de células, demonstrando uma capacidade coletiva de invasão e metástase. Durante a metástase, as células malignas precisam resistir a *anoikis*, uma apoptose celular gerada por falta de adesão. No câncer, as integrinas influenciam as células do hospedeiro associadas ao tumor bem como as próprias células tumorais, tendo o potencial de modular a progressão tumoral, a sobrevivência celular, a invasão e a metástase. A integrina αvβ3 é expressa em diversos tumores humanos, mas está em níveis muito reduzidos ou mesmo ausente nos tecidos normais, sendo considerada um alvo privilegiado na terapia anti-tumoral. Células derivadas da medula óssea, como o monócito/macrófago, também expressam esta integrina, ainda que em níveis reduzidos. A desintegrina recombinante Dis*Ba*-01 atua principalmente sobre as integrinas αvβ3 e αIIbβ3, e parece possuir a capacidade de inibir a adesão celular de linhagens possuindo a integrina αvβ3 à vitronectina. Sendo assim, observou-se a apoptose que pode ser gerada pela inibição da adesão celular ou pela própria presença da desintegrina, um antagonista de integrina que afeta a adesão celular, em linhagem neoplásica e em linhagem imortalizada de macrófagos, utilizando os métodos de marcação com anexina V e técnica de TUNEL, bem como a presença de células viáveis através da técnica de MTT. As linhagens celulares utilizadas nesse experimento foram expostas a desintegrina Dis*Ba*-01 por 24 horas para realização dos testes e as populações celulares aderentes e não aderentes foram analisadas separadamente. Verificou-se uma diminuição na viabilidade celular quando ocorre perda de adesão e na presença da proteína, mas foi observado um resultado não significativo para a ocorrência de apoptose. A desintegrina Dis*Ba*-01 ocasiona uma diminuição na viabilidade celular, entretanto parece não ser por apoptose gerando *anoikis.*

Palavras-chave: apoptose, macrófago, integrina, câncer, desintegrina, adesão celular

ABSTRACT

Cancer is caused by uncontrolled cell proliferation, demonstrating a collective capacity of invasion and metastasis. During metastasis malignant cells also need to resist anoikis, an apoptosis generated by lack of adhesion. In cancer, integrins influence the host cells associated with the tumor and the tumor cells themselves, having the potential to modulate tumor progression, cell survival, invasion and metastasis. The αvβ3 integrin is expressed in many human tumors, but it is at very low levels or even absent in normal tissues, and is considered a prime target in anti-tumor therapy. Cells derived from bone marrow, such as monocyte / macrophages also express this integrin, albeit at reduced levels. The recombinant disintegrin Dis*Ba*-01 acts mainly on integrins αvβ3 and αIIbβ3, and appears to possess the ability to inhibit cell adhesion strains having αvβ3 integrin to vitronectin. Thus, it was observed that apoptosis can be generated by inhibiting cell adhesion or by the presence of disintegrin, an integrin antagonist that affects cell adhesion, in neoplastic and immortalized macrophage lineage, using the methods of labeling with annexin V and TUNEL technique. In addition to checking the cytotoxicity by MTT technique. The cell lines used in this experiment were exposed to Dis*Ba*-01 disintegrin or only the adhesion buffer and incubated for 24 hours for testing cellular cytotoxicity after cell populations were analyzed adherent and nonadherent populations separately, checking a decrease in cell viability when there is loss of adhesion and presence of protein. To perform the tests of TUNEL and Annexin V apoptosis that measure cell lines were exposed to the disintegrin or only culture medium and incubated also for 24 hours, after being analyzed adherent and nonadherent populations separately, obtaining a result no significant like that does not happen anoikis. The disintegrin Dis*Ba*-01 causes a decrease in cell viability, however seems not to be apoptotic generating *anoikis*.

Keywords: apoptosis, macrophage integrin, cancer, disintegrin, cell adhesion

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sequência de códons e aminoácidos correspondentes da desintegrina Dis*Ba*-01 no plasmídeo pET28a-DisBa-01.....27

Figura 2. SDS-PAGE 15% da etapa de indução protéica.....28

Figura 3. SDS-PAGE de alíquotas de S2 antes e após a cromatografia de afinidade em resina de níquel.....29

Figura 4. SDS-PAGE de alíquotas das frações 6 e 7 obtidas na cromatografia de resina de níquel e submetidas a uma cromatografia de troca iônica.....29

Figura 5. Viabilidade celular nas linhagens HUVEC, K562 e SC, quando as células aderiram ou não à fibronectina ou vitronectina.....31

Figura 6. Apoptose inicial observada por Anexina V nas linhagens HUVEC, K562 e SC, quando as células aderiram ou não à fibronectina ou vitronectina.....35

Figura 7. Apoptose tardia observada por TUNEL nas linhagens HUVEC, K562 e SC, quando aderiram ou não à fibronectina ou vitronectina.....36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C. ..Graus Celsius

µg/mL ..... Microgramas por mililitros

µL ..... Microlitro

ANOVA.....Análise de variância

ATCC ..... Coleção americana de tipos de cultura

BSA ..... Soroalbumina bovina

cDNA.....Ácido desoxirribonucléico complementar

CO_2 .....Dióxido de carbono

$CuSO_4.5H_2O$ ..... Sulfato de cobre pentahidratado

DNA .....Ácido desoxirribonucléico

DO .....Densidade ótica

FITC ..... Isotiocianato de fluoresceína

g .....Força da gravidade

HCl ..... Ácido clorídrico

IPTG ..... Isopropila β-D-1-tiogalactopiranosídio

K ..... Potássio

KCl ..... Cloreto de potássio

kDa Dalton..... Quilodalton

M.....Molar

mA .....Miliampère

$MgCl_2$ ..... Cloreto de magnésio

mg ..... Miligramas

min .....Minuto

mL.....Mililitros

mM ..... Milimolar

$MnCl_2$ .....Cloreto de manganês

mRNA..... Ácidos ribonucléicos mensageiros

MTT.....Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

MWCO ..... Ponto de corte de peso molecular

N ..... Normal

Na ..... Sódio

NaCl..... Cloreto de sódio

Na_2CO_3 ..... Carbonato de sódio

NaOH..... Hidróxido de sódio

Nm .....Nanômetros

OMS ..... Organização Mundial da Saúde

PBS ..... Solução salina tamponada com fosfatos

PI.....Iodeto de propídio

RGD.....Motivo tripeptídeo arginina-glicina-aspartato

RPM.....Rotação por minuto

S1 .....Sobrenadante 1

S2 .....Sobrenadante 2

SDS-PAGE ..... Gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio

Tris-HCl..... Solução composta por Trizma base e Ácido clorídrico

TUNEL ..... Marcador de extremidade dUTP livre

UFSCAR.....Universidade Federal de São Carlos

UV ..... Ultravioleta

V ..... Volt

VEGF.....Fator de crescimento endotelial vascular

1. INTRODUÇÃO

Câncer engloba mais de 100 tipos de doenças, sendo o termo utilizado para classificar doenças progressivas derivadas de mutações genéticas que gerem hiperproliferação celular, invasão tecidual e metástases, podendo invadir tecidos próximos ou por meio da circulação sangüínea e do sistema linfático (MERIC et al., 2006; RAULET & GUERRA, 2009). No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, reforçando a magnitude do problema do câncer no país (INCA, 2012).

Os diversos tipos de câncer surgem através de um processo que envolve a desregulação de oncogenes, genes supressores de tumor e sinais apoptóticos. Os oncogenes geralmente são genes ligados à progressão do ciclo celular, à produção de fatores de crescimento e à sobrevivência da célula; já os genes supressores de tumor retardam o avanço no ciclo e estimulam a apoptose. Em uma célula normal, diversos genes influenciam no ciclo celular, no processo de diferenciação da célula e nos mecanismos de morte, enquanto que em um tumor, as alterações genéticas resultam em hiperproliferação de células anteriormente normais, e subsequentes mutações em oncogenes geram um tecido pré-canceroso displásico (HANAHAN & WEINBERG, 2000).

Genes supressores de tumor são ativados por estas alterações iniciais e suprimem o ciclo celular, podendo induzir a apoptose. Para um tumor inicial se tornar um câncer é necessário que ocorram estas mutações dos genes supressores de tumor ou de moléculas intracelulares ligadas a eles e aos mecanismos que eles controlam. Devido à proliferação acentuada, à instabilidade genômica e às prévias alterações genéticas, o acúmulo de novas mutações nas células-filhas pode influenciar na angiogênese, migração e metástase (RAULET & GUERRA, 2009).

A apoptose, descrita primeiramente em 1972, é um processo de morte celular que envolve múltiplas alterações morfológicas, como a redução do volume celular, condensação da cromatina, formação de corpos apoptóticos envolvidos por membrana celular e a fragmentação da membrana nuclear. Observa-se a alteração inicial de receptores celulares, com redução da presença de alguns marcadores (como, por exemplo, CD31) e exteriorização de outros (como fosfatidil serina), e a posterior fragmentação do DNA celular dentre as mudanças mais notáveis neste processo (KERR et al., 1972).

O termo *anoikis* é utilizado para caracterizar a apoptose que ocorre mediante a perda de aderência a um substrato (KROEMER et al., 2009). *Anoikis* é importante para o desenvolvimento normal e para a homeostase do tecido, pois impede que as células que perderam a aderência se liguem novamente em uma matriz extracelular inadequada e cresçam displasicamente (KIM et al., 2012). São passos essenciais durante a progressão tumoral e disseminação metastática de células cancerosas o crescimento independente de ancoragem e a transição epitelial-mesenquimal, duas características associadas a resistência a *anoikis*. Diante disso a desregulação da *anoikis* agora atraiu especial atenção da comunidade científica (TADDEI et al., 2011).

Devido ao crescimento acelerado dos tumores, que esgota as reservas nutricionais antes que um suporte sanguíneo adequado seja formado, as neoplasias apresentam altos níveis de apoptose. Além disso, as células malignas enfrentam estresse mecânico e imunológico, que podem gerar morte celular, durante a metástase, e precisam resistir a *anoikis*, para então conseguirem estabelecer colônias secundárias (KONSTANTOPOULOS & THOMAS, 2009).

Os macrófagos do hospedeiro frequentemente se associam ao tumor, podendo produzir citocinas, fatores de crescimento e fatores pró-angiogênicos que contribuem para imunossupressão local e crescimento tumoral (MANTOVANI et al., 2008). Em tumores, a eliminação de células apoptóticas pode ser mediada por estes macrófagos residentes, por

células estromais e pelas próprias células tumorais. A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos pode gerar uma resposta imune local mais intensa, normalmente levando à supressão de mediadores pró-inflamatórios e à produção de diversos mediadores anti-inflamatórios. Além dos efeitos imunossupressivos e anti-inflamatórios, a resposta de células vizinhas que interagem com células apoptóticas pode gerar a produção de fatores de crescimento e fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*). Sendo assim, é notável que em tumores humanos o alto nível de apoptose intra-tumoral se correlacione a um pior prognóstico (GREGORY & POUND, 2011).

Integrinas são proteínas não enzimáticas transmembrana envolvidas no controle da adesão celular. São receptores heterodiméricos α/β de membrana que medeiam interações célula-célula e de fixação das células à matriz extracelular. A pequena porção citoplasmática se liga ao citoesqueleto de actina e ao maquinário de sinalização intracelular e a porção extracelular da integrina se liga a componentes da matriz extracelular ou em receptores de células vizinhas. Tais interações proporcionam uma ancoragem estável das células aos tecidos, assim como mobilidade e migração. A adesão mediada pela integrina também gera uma cascata intracelular e pode alterar a morfologia, migração, sobrevivência, proliferação e diferenciação (AVRAAMIDES et al., 2008; DANEN, 2009; DAVIS, 2009; AOUDJIT & VUORI, 2012).

O microambiente tumoral, que é composto pelo tecido neoplásico, células imunes, células estromais e células perivasculares, sendo capaz de gerar inflamação e angiogênese influencia drasticamente a progressão tumoral (LIN & POLARD, 2007). Em relação às integrinas, estas se localizam tanto nas células tumorais quanto nas do hospedeiro, em regiões da membrana próximas aos receptores de fatores de crescimento ou de citocinas que tenham sido ativados e há uma "comunicação" entre estas duas moléculas, tanto nas células tumorais

quanto nas células inflamatórias associadas ao tumor. Consequentemente, a progressão tumoral e invasão dependem fundamentalmente desta relação molecular (CROCI et al., 2007; DESGROSELLIER & CHERESH, 2010).

A integrina αvβ3 (CD51/CD61) pode se ligar a diversos compostos ao reconhecer o motivo tripeptídeo arginina-glicina-aspartato (RGD), especialmente a vitronectina e fibronectina. Ela é expressa em diversos tumores humanos e em regiões de ampla inflamação ou cicatrização, entretanto está em níveis muito reduzidos ou mesmo ausente nos tecidos humanos normais. Células derivadas da medula óssea, como o monócito/macrófago, também expressam esta integrina, apesar de não ser em quantidades muito elevadas. Esta integrina parece estar relacionada ao controle do crescimento celular, sobrevivência e migração durante a angiogênese (KONSTANTOPOULOS & THOMAS, 2009; DESGROSELLIER & CHERESH, 2010).

As desintegrinas, um dos possíveis antagonistas de integrina, são moléculas derivadas de metaloproteinases de venenos de serpentes (FOX & SERRANO, 2005). Estas moléculas são peptídeos solúveis de 40 a 100 aminoácidos, que pertencem a uma família de proteínas não enzimáticas, de baixo peso molecular e rico em cisteínas, capazes de afetar a adesão celular e inibir a agregação plaquetária. A maioria das desintegrinas derivadas das metaloproteinases do tipo P-II contêm sequências RGD, que se antagonizam fortemente às integrinas αIIbβ3 e αvβ3 (MCLANE et al., 2004).

A desintegrina recombinante Dis*Ba*-01, obtida utilizando-se a tecnologia de DNA recombinante a partir de ácidos ribonucleicos mensageiros (mRNAs) extraídos da glândula venenífera de um espécime de *Bothrops alternatus*, popularmente conhecida como urutu-cruzeiro, é monomérica e é derivada de uma metaloproteinase de tipo P-II. Esta desintegrina possui massa molecular de 11,637 kDa e 6 pontes dissulfeto, podendo ser produzida de forma heteróloga em bactérias e posteriormente purificada. É RGD-dependente, e atua

principalmente sobre as integrinas αvβ3 e αIIbβ3, tendo uma maior região de contato com a subunidade β3. *In vitro*, esta desintegrina inibe a proliferação de células endoteliais de capilares da derme e inibe a adesão à vitronectina. Em modelo animal utilizando a linhagem celular B16F10 de melanoma, a Dis*Ba*-01 reduz significativamente a implantação de metástases pulmonares da neoplasia (KAUSKOT et al., 2008; RAMOS et al., 2008; OLIVEIRA, 2009).

A capacidade da desintegrina Dis*Ba*-01 de inibir a adesão celular, e levar a *anoikis,* poderia ser verificada devido as diversas modificações morfológicas que ocorrem durante o processo de morte celular. Sob condições fisiológicas, fosfatidilcolina e esfingomielina são expostos na camada externa da membrana plasmática enquanto fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina são exclusivamente localizados na superfície citoplasmática da bicamada lipídica. Esta assimetria está embaralhada durante apoptose (KERR et al., 1972).

Ao utilizar anexina V em conjunto com marcador plasmático a permeabilidade da membrana pode ser distinta entre células vivas, apoptóticas e necróticas, sendo utilizada como marcador de apoptose. Células vivas coradas com anexina V e iodeto de propídio (PI) possuem fluorescência mínima de anexina V e de PI. Nas fases iniciais da apoptose, as células coram com anexina V, mas ainda excluem PI. Finalmente, quando a cascata apoptótica chega a estágios mais avançados, as células necróticas coram intensamente com ambas as sondas (WLODKOWIC et al., 2011).

Durante apoptose ocorre também a fragmentação do DNA. Os terminais 3'-OH das quebras podem ser corados, anexando um fluorocromo a eles, atuando como marcador de apoptose. Essa reação é comumente conhecida como TUNEL ("*Terminal dUTP Nick-End Labeling*") (WLODKOWIC et al., 2011).

O ensaio de MTT é baseado na conversão do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) em cristais de formazana por células vivas, que determinam a

atividade mitocondrial. Uma vez que, para a maioria das populações celulares o total de atividade mitocondrial é relacionado com o número de células viáveis, este ensaio é amplamente usado para medir os efeitos citotóxicos, *in vitro*, de drogas em linhagens celulares (VAN MEERLOO et al., 2011).

Contudo, o objetivo do presente trabalho é observar a indução de apoptose gerada pela inibição da adesão celular (*anoikis*) ou diretamente pela atuação da Dis*Ba*-01.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Observar se ocorre indução de apoptose gerada pela desintegrina Dis*Ba*-01 em células portando ou não a integrina αvβ3.

2.2. Objetivos Específicos

- Obter a desintegrina Dis*Ba*-01 em sua forma livre em quantidade suficiente para os testes seguintes;

- Verificar a citotoxicidade de Dis*Ba*-01 em linhagens que expressem ou não integrina αvβ3 através da técnica de MTT;

- Verificar a indução de apoptose nas linhagens celulares através da observação da exposição de fosfatidil serina nas membranas celulares através da marcação com anexina V;

- Verificar a capacidade de indução de apoptose observando a fragmentação do DNA nuclear nas linhagens celulares através da técnica de TUNEL.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1. Materiais e Métodos

3.1.1. Obtenção da desintegrina DisBa-01

A proteína recombinante Dis*Ba*-01 foi expressa e purificada na Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), sob o acompanhamento da professora Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo. A metodologia utilizada para obtenção da proteína está descrita no trabalho de Ramos et al. (2008). A desintegrina foi obtida a partir de mRNAs da glândula de veneno da serpente *Rhinocerophis alternatus* (*Bothrops alternatus*), a partir dos quais foi feita uma biblioteca de cDNA. O produto correspondente à Dis*Ba*-01 foi introduzido em um vetor de expressão pET28a fusionado a tireodoxina e posteriormente inserido em bactérias *Escherichia coli* BL21 (DE3). A partir da colônia bacteriana, a proteína pode ser expressa e purificada.

Rapidamente, um inóculo da cultura de bactérias *E. coli* foi colocada em meio LB seletivo com kanamicina (30 μg/mL; Sigma-Aldrich) para proliferação celular. A cultura permaneceu sob agitação a 37°C até atingir densidade ótica (DO) a 660 nm de 0,4 a 0,6. Então, foi realizada a indução de expressão protéica através da adição de IPTG (isopropila β-D-1-tiogalactopiranosídio) em uma concentração final de 0,5 mM, a 37°C sob agitação constante a 250 rpm. Após 3 horas, as culturas foram centrifugadas a 9000 g a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em tampão de ligação, composto de 20 mM de Tris-HCl, 0,5 M de NaCl e Imidazol a 5 mM em um volume de 10% do volume inicial da cultura. A suspensão celular foi incubada no gelo por 30 minutos e, então, foi realizada uma lise celular por ondas ultrassom, com 6 repetições com duração de 1 minuto e intervalo de 30 segundos, amplitude de 20 hertz. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 13000 rpm, por 15 minutos a 4°C. O sobrendante (S1) foi armazenado a -20°C para realização posterior de um gel de poliacrilamida SDS-PAGE, conforme descrito a seguir,

e o precipitado foi ressuspenso em tampão de ligação com 6 M de uréia, em um volume 5% do volume total da expressão. Em seguida, foi realizada uma nova lise por meio de ultrassom, conforme já descrito. O lisado foi novamente centrifugado a 13000 rpm, por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante (S2) foi armazenado a -20°C. Após a confirmação da expressão através de SDS-PAGE, realizou-se a purificação da Dis*Ba*-01.

3.1.2. Purificação e concentração da desintegrina DisBa-01

O sobrenadante (S2) da expressão foi submetido a um processo cromatográfico de afinidade por níquel (Ni-NTA, Quiagen), sob condições desnaturantes. As frações eluídas, através de um gradiente de imidazol (Imidazol 1 M, NaCl 0,5 M, HCl 160 mM, pH 7,9) e contendo a proteína Dis*Ba*-01, foram dialisadas utilizando membrana 3,5 MWCO, uma vez contra uréia 3 M e três vezes contra água Milli-Q, 1 hora para cada troca, e concentradas sob vácuo até o volume de 1 mL.

Na segunda etapa de purificação, a amostra dialisada e concentrada foi aplicada em uma coluna de troca iônica Mono Q 5/50GL (GE Healthcare). Para a separação por gradiente em cromatografia de alta pressão foi utilizado o equipamento AKTA (GE), com os referentes tampões (tampão de equilíbrio: Tris-HCl 20 mM, pH 8,6; e tampão de eluição: Tris-HCl 20 mM e NaCl 1 M, pH 8,6), sob fluxo constante (2,0 mL/min) com gradiente linear de cloreto de sódio (0 a 1 M). As frações foram novamente analisadas em SDS-PAGE. As frações eluídas foram submetidas a um processo de diálise com membrana 3,5 MWCO, quatro vezes contra água Milli-Q, 30 minutos para cada troca.

3.1.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As frações cromatográficas eluidas na coluna de resina de níquel e, posteriormente, obtidas após separação em coluna Mono Q 5/50 foram analisadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, conforme a técnica de Laemmli (1970). Resumidamente, alíquotas das amostras foram diluídas em tampão de amostra, composto por Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8), dodecil sulfato de sódio (SDS) a 4%, azul de bromofenol a 0,025%, glicerol a 20% e β-mercaptoetanol 0,1 M. As alíquotas foram, então, aplicadas em gel de empilhamento de 5% de poliacrilamida e gel de resolução de 15%, e submetidas à eletroforese com corrente elétrica de 15 mA e voltagem de 125 V. Os padrões moleculares utilizados foram produzidos a partir de proteínas obtidas da Sigma-Aldrich. As bandas protéicas foram detectadas por coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich).

3.1.4. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), modificado por Fryer et al. (1986). O princípio do método consiste na formação de complexos de cobre presente no Reagente Reativo com a proteína presente na amostra. Com a adição do reagente de Folin ocorre a redução do mesmo por reação com os complexos de cobre.

Resumidamente, 100 µL de cada uma das amostras foram colocados em poços de uma microplaca de 96 poços, e acrescidos de 200 µL do Reagente Reativo, (100 mL de Na_2CO_3 2% em NaOH 0,1 N; 1 mL de $CuSO_4.5H_2O$ 1%; 1 mL de Tartarato de Na e K 2%). Foi feita uma incubação por 15 minutos em temperatura ambiente. A seguir, foi acrescentado 20 µL do reagente de Folin 1 N e homogeneizado rapidamente. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos para completa formação de cor. A leitura foi feita em

espectrofotômetro em filtro de 620 nm. Um branco contendo apenas NaOH 0,1 M foi submetido a todos os passos citados. Uma curva de concentrações conhecidas de soroalbumina bovina (BSA – Sigma Aldrich) foi utilizada como padrão. Os resultados foram expressos em μg/mL de proteína.

3.1.5. Linhagens celulares

Para realizar os ensaios biológicos, as linhagens celulares foram adquiridas na American Type Culture Collection (ATCC). Foram utilizadas apenas linhagens humanas, a saber:

1) SC (ATCC CRL-9855), uma linhagem normal imortalizada de monócitos/macrófagos (YAMAMOTO et al., 2007).

2) HUVEC (ATCC CRL-2873), linhagem de endotélio vascular humano, capaz de expressar αvβ3 (TEKLEMARIAM et al., 2011).

3) K-562 (ATCC CCL-243), células neoplásicas: linfoblastos indiferenciados; esta linhagem apresenta predominantemente integrina α5β1, e não expressa αvβ3 ou αIIbβ3 (GENTILUCCI et al., 2010).

As linhagens celulares foram mantidas em garrafas contendo meio de cultura adequado, de acordo com as necessidades nutricionais de cada uma (meios de cultura adquiridos da Dubelcco, acrescidos de aminoácidos ou outros fatores), suplementado com soro fetal bovino (Gibco) conforme necessário, e mantidas a 37ºC, em estufa com 5% de CO_2. Os repiques foram feitos de 1 a 3 vezes por semana, conforme as características de cada linhagem.

3.1.6. Preparo das placas de cultura sensibilizadas

Placas de cultura estéreis de 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.) foram sensibilizadas com 80 μL de vitronectina (0,5 μg/mL) diluída em água Milli-Q por 2 horas a 37ºC. As placas foram bloqueadas com 200 μL de uma solução de soroalbumina bovina (solução de BSA 1% diluída em tampão de adesão constituído de KCl 5 mM, NaCl 150 mM, Hepes 20 mM, $MgCl_2$ 5mM, $MnCl_2$ 1 mM, pH 7,4). Placas de cultura estéreis de 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.) foram sensibilizadas com 80 μL de fibronectina (5 μg/mL) diluída em tampão fosfatado salino pH 7,4 por 18 horas a 4ºC. As placas foram bloqueadas com 200 μL de uma solução de soroalbumina bovina (solução de BSA 1% diluída em tampão de adesão).

Em todos os ensaios que utilizou placas sensibilizadas, uma placa controle foi preparada através da incubação com BSA 1% em tampão fosfatado salino (PBS), por 18 horas a 4ºC, e igualmente bloqueada. As placas foram então armazenadas a 4°C até o momento de uso. Antes do uso, as placas sensibilizadas foram lavadas com 200 μL de tampão de adesão. As placas de cultura sensibilizadas com vitronectina foram utilizadas para os ensaios com as células HUVEC e SC, enquanto as placas sensibilizadas com fibronectina foram utilizadas para os ensaios com as células K562 e SC.

3.1.7. Ensaio de citotoxicidade celular em células aderidas ou não aderidas

Para o ensaio de viabilidade celular foi utilizado o método baseado na capacidade das células viáveis de clivar o anel tetrazólico presente no sal de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de formazana (MOSMANN, 1983). O princípio deste ensaio é que para a maioria das células viáveis a atividade mitocondrial é constante, e assim, um aumento ou diminuição no número de células viáveis é linearmente relacionada com a

atividade mitocondrial. Assim, qualquer aumento ou diminuição no número de células viáveis pode ser detectado pela medição da concentração de formazana mostrada na leitura de densidade óptica realizando-a em 540 e 720nm (VAN MEERLOO et al., 2011).

Cada suspensão celular, no meio preferencial de cada célula, a $5x10^5$ células/mL foi exposta à solução protéica de Dis*Ba*-01 a 10 µM diluída em tampão de adesão (constituído de KCl 5 mM, NaCl 150 mM, Hepes 20 mM, $MgCl_2$ 5mM, $MnCl_2$ 1 mM, pH 7,4 sendo este o controle negativo) ou apenas tampão de adesão sem proteína, em volumes iguais, por 30 min a 37°C. Às placas de cultura estéreis sensibilizadas com fibronectina ou vitronectina (item 3.1.6.), foram distribuídos 100 µL da solução celular por cavidade, em duplicata. As placas foram incubadas por 24 horas a 37ºC em estufa contendo tensão constante de 5% de CO_2 (Forma Scientific, EUA).

Posteriormente, as células não aderidas foram retiradas por aspiração e transferidas para uma placa de cultura estéril não sensibilizada. Foram acrescentados 20 µL de uma solução de MTT a 5 mg/mL e as placas foram incubadas nas mesmas condições anteriores por 4 horas. Após esse procedimento, as placas foram centrifugadas a 800 g por 10 minutos a 10°C em centrífuga refrigerada (Hettich, Alemanha). Os sobrenadantes foram retirados por aspiração com auxílio de uma micropipeta e descartados, e as células foram tratadas com 100 µL de isopropanol (Mallinckrodt) para solubilizar os cristais de formazana formados.

As células que se mantiveram aderidas à placa de cultura sensibilizada foram lavadas por acréscimo e descarte de tampão de adesão, 2 vezes. Após o descarte, foram acrescentados 100 µL de uma solução de MTT a 1 mg/mL e as células foram incubadas nas mesmas condições anteriores por 4 horas. O sobrenadante foi então descartado e as células foram tratadas com 100 µL de isopropanol (Mallinckrodt) para solubilizar os cristais de formazana formados.

A leitura da densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro em UV/visível a 540 nm, com filtro de referência de 620 nm. A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando-se o controle negativo como 100% de viabilidade.

3.1.8. Apoptose por Anexina V

A externalização de fosfatidil serina durante o processo de apoptose pode ser captada pela proteína anexina V, que na presença de íons de cálcio exibe alta afinidade para ligação seletiva a fosfatidilserina. Acoplada ao fluorocromo FITC, as células marcadas com anexina V podem ser contabilizadas em citômetro de fluxo. A metodologia foi realizada utilizando o kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma), conforme instruções do fabricante.

Rapidamente, às placas de cultura estéreis de 96 cavidade de fundo plano (Corning, Inc.) sensibilizadas com vitronectina ou fibronectina, conforme item 3.1.6., foram distribuídos 100 μL por cavidade das suspensões de cada linhagem celular, ajustadas à concentração de $1x10^5$ células/mL no meio de cultura preferencial de cada uma, em presença de 100 μL de uma solução de Dis*Ba*-01 a 10 μM ou apenas meio de cultura (controle negativo), em duplicata. As placas foram incubadas por 24 horas a 37ºC em estufa contendo tensão constante de 5% de CO_2 (Forma Scientific, EUA). As linhagens celulares foram então recolhidas e colocadas em um tubo falcon. As populações não aderentes foram obtidas apenas por aspiração. A seguir, as células que se mantiveram aderidas foram lavadas com tampão e foram tripsinizadas e recolhidas para outro tubo falcon.

A seguir foi adicionado à cultura celular 400 μL de tampão de ligação, 5 μL de anexina V-FITC e 5 μL de iodeto de propídio (2 μg/mL). Após incubação de 10 minutos, foram adicionados 100 μL de paraformaldeído a 1% na mistura e esta foi mantida a 4°C. No momento da leitura, foram adicionados 400 μL de tampão de ligação a cada tubo e as células analisadas no citômetro de fluxo FACS CANTO conforme instruções do fabricante.

3.1.9. Apoptose por TUNEL

A quebra do DNA genômico, que ocorre no processo de apoptose, origina fragmentos de DNA. Estes podem ser identificados por marcação das terminações 3´-OH livres, através de uma reação enzimática que catalisa a incorporação de nucleotídeos modificados (marcados com fluoresceína), chamado teste do TUNEL ("Terminal dUTP Nick-End Labeling"). A técnica foi realizada utilizando-se o kit *In Situ Cell Death Detection Kit* (Roche), conforme instruções do fabricante.

Resumidamente, às placas de cultura estéreis de 96 cavidade de fundo plano (Corning, Inc.) sensibilizadas com vitronectina ou fibronectina, conforme item 3.1.6., foram distribuídos 100 μL por cavidade das suspensões de cada linhagem celular, ajustadas à concentração de $1x10^5$ células/mL no meio de cultura preferencial de cada uma, em presença de 100 μL de uma solução de Dis*Ba*-01 a 10 μM ou apenas meio de cultura (controle negativo), em duplicata. As placas foram incubadas por 24 horas a 37ºC em estufa contendo tensão constante de 5% de CO_2 (Forma Scientific, EUA). As linhagens celulares foram então recolhidas e colocadas em um tubo falcon. As populações não aderentes foram obtidas apenas por aspiração. A seguir, as células que se mantiveram aderidas foram lavadas com tampão e foram tripsinizadas e recolhidas para outro tubo falcon.

Foram expostas à 100 μL de tampão de fixação, e incubadas por 60 minutos. As células foram lavadas com tampão de lavagem e ressuspensas em 100 μL de tampão de permeabilização. A seguir, às amostras foram acrescentados 50 μL do reagente de TUNEL; e no controle negativo, 50 μL da solução de ligação, somente. As amostras foram incubadas por 60 minutos a 37°C em câmara úmida, ao abrigo da luz. A seguir, foram adicionados 5 μL de iodeto de propídio a 2 μg/mL e foi realizada uma incubação de 10 minutos nas mesmas condições anteriores. A leitura foi feita em citômetro de fluxo FACS CANTO conforme instruções do fabricante.

3.1.10. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando um método de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste *t*-Student na versão de comparações múltiplas de Tukey-Kramer para avaliar a diferença significativa entre pares. Valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, Estados Unidos).

3.2. Detalhamento dos Progressos Realizados

3.2.1. Obtenção da desintegrina DisBa-01

A desintegrina Dis*Ba*-01, cuja sequência está disposta na Figura 1, foi induzida e purificada a partir de uma colônia de *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformada para portar o plasmídeo pET28a-Dis*Ba*-01, conforme descrito nos itens 3.1.1. e 3.1.2.

```
  1  GGA AAT GAA CTT TTG GAG GCG GGA GAA GAA TGT GAC TGT GGC ACT  45
       G   N   E   L   L   E   A   G   E   E   C   D   C   G   T

 46  CCT GGA AAT CCG TGC TGC GAT GCT GCA ACC TGT AAA CTG AGA CCA  90
       P   G   N   P   C   C   D   A   A   T   C   K   L   R   P

 91  GGG GCG CAG TGT GCA GAA GGA CTG TGT TGT GAC CAG TGC AGA TTT  135
       G   A   Q   C   A   E   G   L   C   C   D   Q   C   R   F

136  ATG AAA GAA GGA ACA GTA TGC CGG ATT GCA AGG GGT GAT GAC ATG  180
       M   K   E   G   T   V   C   R   I   A   R   G   D   D   M

181  GAT GAT TAC TGC AAT GGC ATA TCT GCT GGC TGT CCC AGA AAT CCC  225
       D   D   Y   C   N   G   I   S   A   G   C   P   R   N   P

226  TTC CAT GCC TAA 237
       F   H   A   *
```

Figura 1. Sequência de códons e aminoácidos correspondentes da desintegrina Dis*Ba*-01 no plasmídeo pET28a-DisBa-01. Os códons marcados em cinza representam a sequência RGD, passível de se ligar à integrina αvβ3 ou αIIbβ3; o códon marcado com * representa o códon de parada.

Fonte: GONÇALVES DFC (2008). Minimização da estrutura da Dis*Ba*-01, uma desintegrina com potenciais atividades anti-trombótica e anti-metastática. Dissertação. Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Os passos de indução e purificação da desintegrina foram acompanhados por SDS-PAGE, conforme descrito no item 3.1.3. Pôde-se observar uma gama de proteínas presentes no extrato celular ou no sobrenadante da cultura antes e após a indução com IPTG (Figura 2). Esta quantidade parece ser mais significativa após a indução com IPTG, principalmente no sobrenadante após 3 horas de indução (S2). Tendo em vista a presença de proteínas diversas, seguiu-se uma etapa de purificação de S2.

A primeira etapa de purificação foi feita em resina de níquel sob condições desnaturantes, eluindo-se frações através de um gradiente de imidazol, conforme descrito no item 3.1.2. A Figura 3 demonstra alíquotas desta purificação em gel SDS-PAGE. Observou-se que as frações eluídas E e F apresentaram maiores quantidades de proteína com peso molecular aproximado dentro do esperado de aproximadamente 10 kDa, visto que a proteína Dis*Ba*-01 pesa 11,637 kDa.

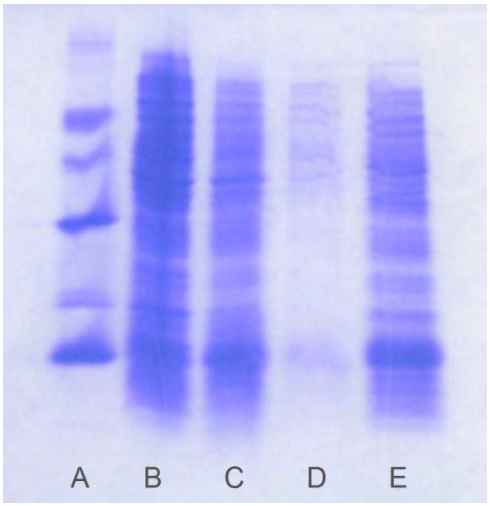


Figura 2. SDS-PAGE 15% da etapa de indução protéica: (A) Padrão molecular; (B) extrato celular lisado antes da indução; (C) extrato celular lisado após 3 horas de indução; (D) sobrenadante de cultura antes da indução (S1); (E) sobrenadante de cultura 3 horas após indução (S2).

Fonte: Desenvolvido por Lívia Carolina de Abreu Ribeiro.

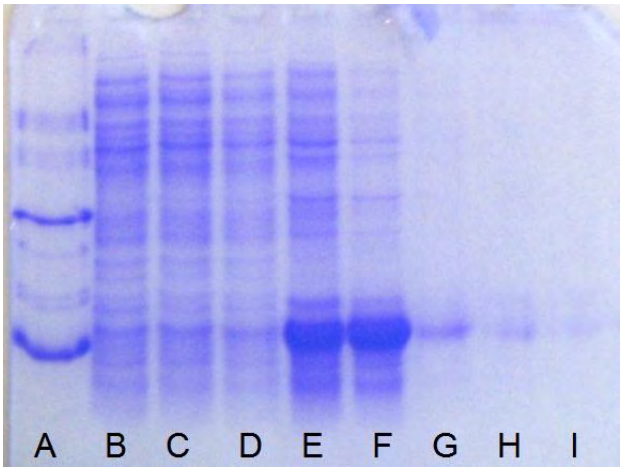


Figura 3. SDS-PAGE de alíquotas de S2 antes e após a cromatografia de afinidade em resina de níquel. (A) Padrão molecular; (B) sobrenadante após 3 horas de indução sem purificação (S2); (C-I) Frações eluídas na purificação.

Fonte: Desenvolvido por Lívia Carolina de Abreu Ribeiro.

Estas frações passaram por uma nova etapa de purificação: a troca iônica. Esta purificação foi realizada em coluna MonoQ 5/50GL com gradiente linear de cloreto de sódio de 0 a 1 M (Figura 4).

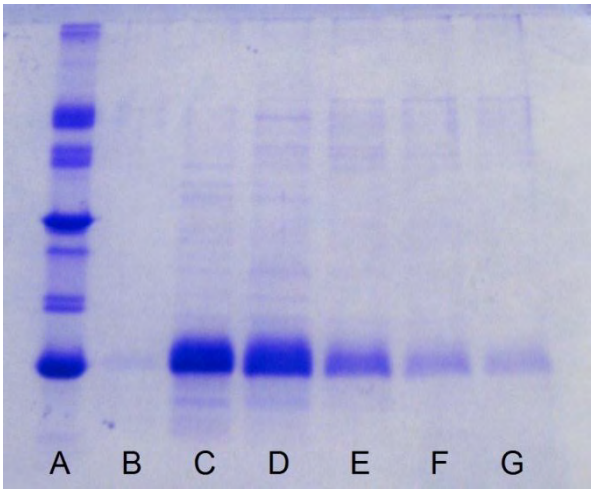


Figura 4. SDS-PAGE de alíquotas das frações E e F obtidas na cromatografia de resina de níquel e submetidas a uma cromatografia de troca iônica. (A) Padrão molecular; (B-G) frações eluídas na purificação.

Fonte: Desenvolvido por Lívia Carolina de Abreu Ribeiro.

Após a purificação, as frações foram dialisadas até o volume final de 1 mL em tampão fosfatado (PBS). A dosagem protéica foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), modificado por Fryer et al. (1986).

3.2.2. Ensaio de citotoxicidade celular em células aderidas ou não aderidas

A determinação da viabilidade celular foi realizada segundo o método do MTT em cultura das linhagens HUVEC, SC e K-562, tratadas ou não com a proteína Dis*Ba*-01 a 10 μM, conforme descrito no item 3.1.7. Os diferentes resultados obtidos foram expressos em percentual de viabilidade e estão ilustrados na Figura 5.

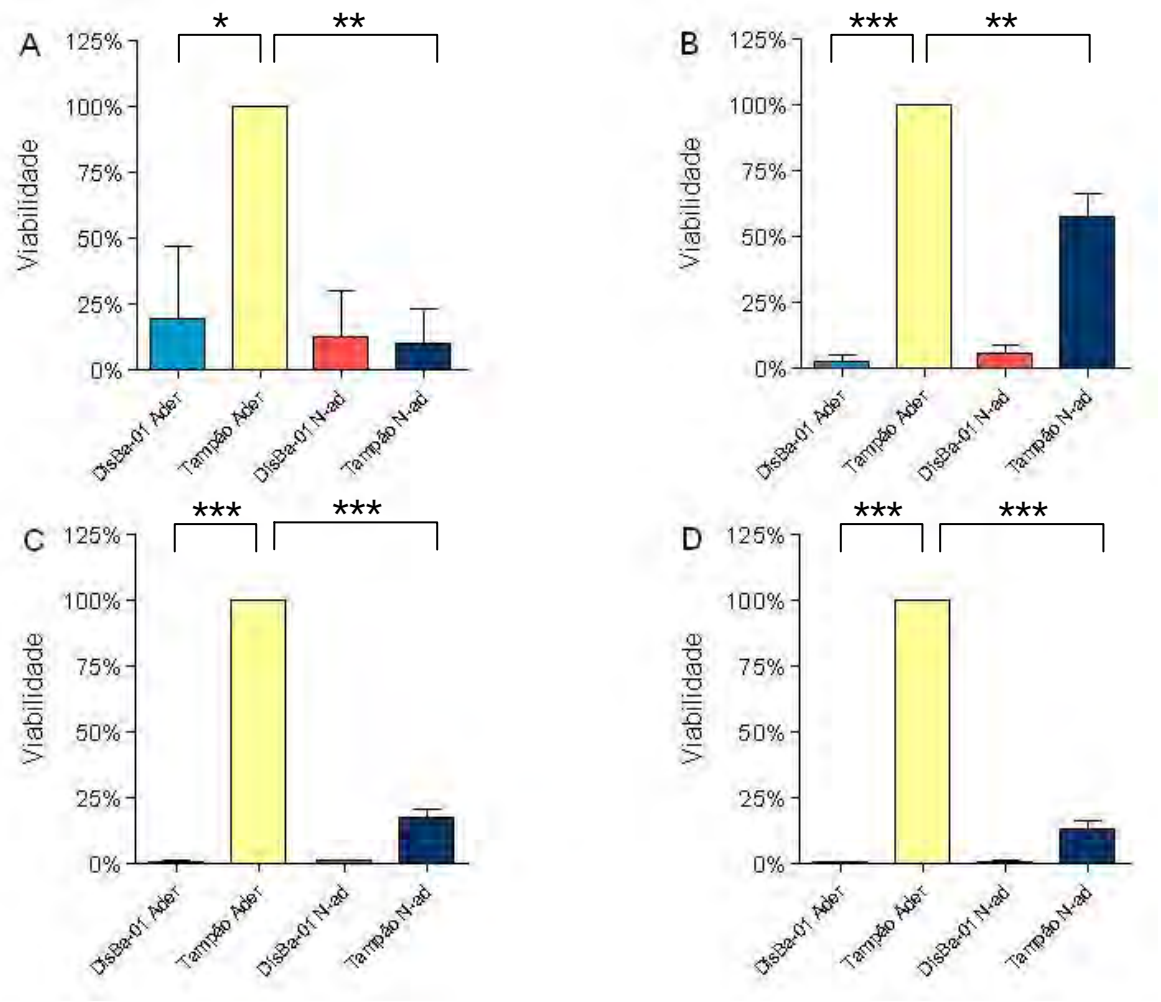


Figura 5. Viabilidade celular nas linhagens HUVEC (A), K562 (B) e SC (C e D), quando as células aderiram ou não à fibronectina (B e C) ou vitronectina (A e D). As células foram expostas à proteína Dis*Ba*-01 a 10 μM ou apenas tampão. Foi utilizado BSA como controle para a adesão celular. Foi analisada a viabilidade celular das células que permaneceram aderidas (Ader) e daquelas que perderam a adesão (N-ad). Resultados expressos em porcentagem de células viáveis. Análise estatística por ANOVA seguido de teste de Tukey: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Na linhagem de células HUVEC (Figura 5A), as células que foram expostas somente ao tampão e que sofreram perda de adesão apresentaram um aumento significativo na morte celular se comparadas às que se mantiveram aderidas (p<0,01), indicando que estas células parecem ser sensíveis a *anoikis*. Ainda, observamos que a presença de Dis*Ba*-01 a 10 μM foi

capaz de reduzir significativamente a viabilidade das células aderentes quando comparada ao controle tampão de adesão ($p<0,05$), demonstrando que a proteína pode gerar morte celular diretamente ou esta pode causar perda de adesão ao substrato, como já é relatado (RAMOS et al., 2008) e esta perda de adesão pode vir a acarretar *anoikis* (KROEMER et al., 2009). A comparação entre células que se mantiveram aderidas após o tratamento com a proteína Dis*Ba*-01 na concentração de 10 μM e aquelas que se soltaram após o tratamento revelou que ambas apresentaram altos índices de morte celular ($p>0,05$). Entretanto, ainda não concluímos se a proteína em si pode causar morte celular por atuação diretamente nas células, ou apenas a perda de adesão gera esta morte.

Na linhagem de células K562 (Figura 5B) a comparação entre células aderentes e não aderentes, submetidas apenas ao tampão de adesão, revelou uma diferença significativa de $p<0,001$, o que indica a susceptibilidade desta linhagem celular à *anoikis*. Ainda, o tratamento com a proteína Dis*Ba*-01 na concentração de 10 μM resultou em redução significativa da viabilidade das células aderentes ($p<0,001$) em comparação ao controle negativo (tampão de adesão). Por ser esta uma linhagem celular com concentração virtualmente nula de integrina αvβ3 (GENTILUCCI et al., 2010), pode-se enfatizar novamente a possibilidade da desintegrina Dis*Ba*-01 causar morte celular diretamente, e não apenas por *anoikis*. Devido a isso, observa-se também que a presença da desintegrina gera altos níveis de morte celular independentemente se a população celular se manteve aderida ou se perdeu esta adesão ($p>0,05$).

Já na linhagem celular SC (Figura 5C e 5D) quando observada a viabilidade de células que se mantiveram aderentes mediante tampão de adesão e aquelas que não aderiram, observa-se um aumento na morte celular da população não aderida, independente da matriz extracelular utilizada ($p<0,001$). Isso indica que, em nosso modelo, a célula SC também parece ser sensível à *anoikis*. O tratamento com a proteína Dis*Ba*-01 na concentração de 10

μM resultou em redução significativa da viabilidade das células aderentes em comparação ao controle negativo (tampão de adesão), quando estas foram cultivadas na presença de fibronectina ($p<0,001$) ou vitronectina ($p<0,001$). Como supõe-se que a proteína Dis*Ba*-01 só afete significativamente a adesão celular à vitronectina (RAMOS et al., 2008), apesar de que a influência de adesão à fibronectina possa existir em altas concentrações, utilizando-se a proteína pelo menos 100 vezes mais concentrado do que a concentração utilizada em nosso estudo (PEDRETTI, 2009), parece claro que a desintegrina atue diretamente na célula causando redução da viabilidade celular, não apenas atuando através da *anoikis*. A comparação entre células aderentes e não aderentes, submetidas ao mesmo tratamento com a proteína Dis*Ba*-01 na concentração de 10 μM, revelou uma baixíssima viabilidade celular ($p>0,05$), independente da matriz utilizada. Similar aos resultados obtidos para a célula HUVEC, esta linhagem celular também parece ser sensível à morte celular causada pela desintegrina.

Diante dos resultados obtidos pode-se perceber que a adesão a um substrato leva a uma maior sobrevida celular. Isso pode ser evidenciado quando se compara os resultados da proteína aderente com os da proteína não aderente, tratadas com a mesma concentração de proteína.

Para as células HUVEC e SC era esperado resultados mais evidentes entre as células aderentes e não aderentes, uma vez que essas linhagens sofrem maior influência dessa proteína quando forem se aderir à vitronectina. Enquanto que para a linhagem celular K562 ou SC quando exposta à fibronectina era de se esperar que não apresentassem uma diferença entre os resultados tão evidente. No modelo experimental utilizado não foi obtido diferença significativa entre os resultados das linhagens HUVEC e SC entre células aderentes e não aderentes em matriz de vitronectina; e as linhagens K562 e SC expostas a fibronectina apresentaram um resultado evidente, indicando uma possível ação direta da desintegrina.

Sendo assim, novos estudos deverão ser realizados para a elucidação dos mecanismos de ação da desintegrina Dis*Ba*-01 envolvidos no processo de morte celular.

3.2.3. Apoptose em células aderidas e não aderidas

O processo de morte celular conhecido como apoptose gera múltiplas alterações morfológicas. Entre elas, observa-se durante o processo de apoptose inicial a externalização de fosfatidil serina, enquanto que no processo de apoptose tardio, a quebra do DNA genômico origina fragmentos de DNA. Essas modificações podem ser utilizadas como marcadores de apoptose uma vez que a fosfatidil serina externalizada pode ser captada pela proteína anexina V, que acoplada ao fluorocromo FITC, tornando possível a contagem celular em citômetro de fluxo. Já os fragmentos de DNA podem ser identificados por marcação das terminações 3´-OH livres, através da incorporação de nucleotídeos modificados (marcados com fluoresceína). Sendo assim, a fase inicial foi detectada utilizando o kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma). Enquanto que a apoptose tardia utilizou o kit In Situ Cell Death Detection Kit (Roche), também conhecido como TUNEL.

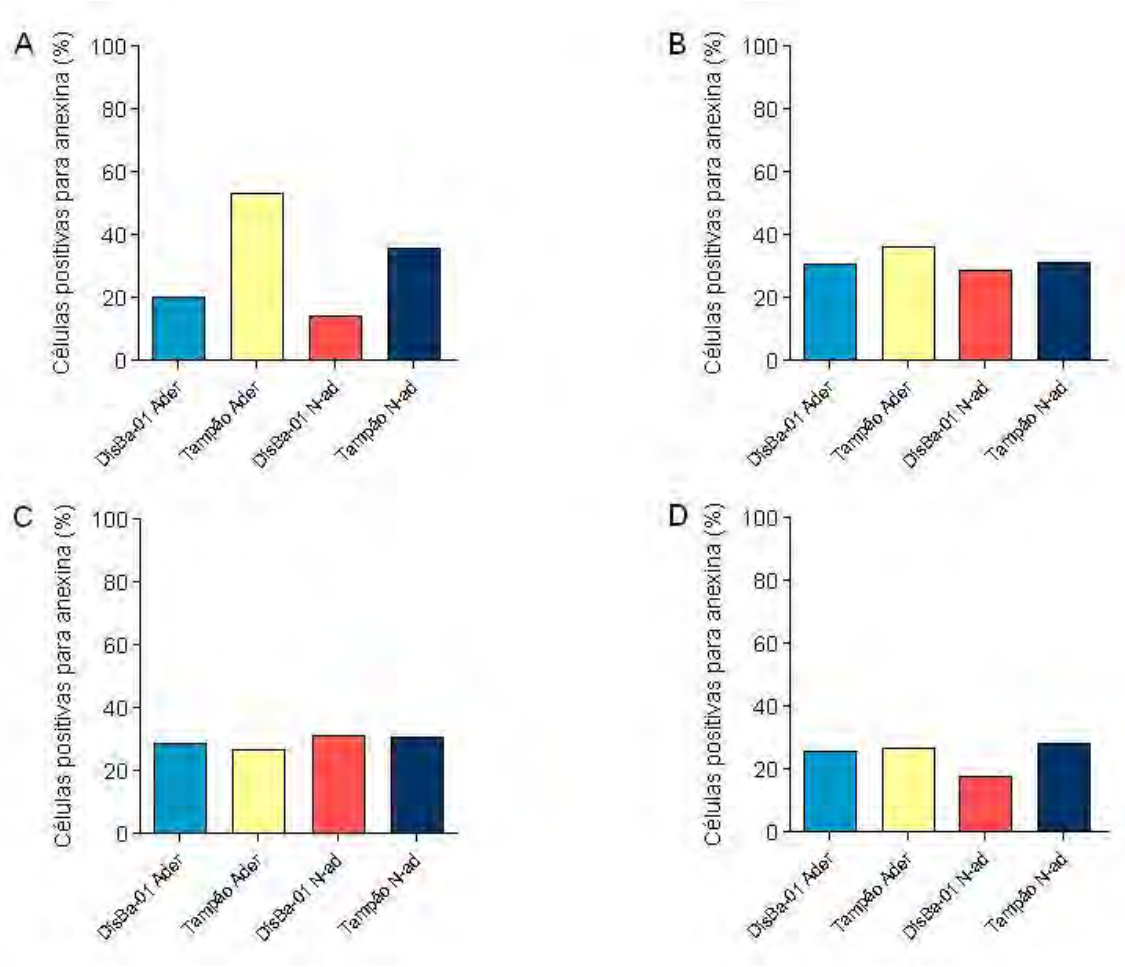


Figura 6. Apoptose inicial observada por Anexina V através do kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma) nas linhagens HUVEC (A), K562 (B) e SC (C e D), quando as células aderiram ou não à fibronectina (B e C) ou vitronectina (A e D). As células foram expostas à proteína Dis*Ba*-01 a 10 μM ou apenas tampão. Foi utilizado BSA como controle para a adesão celular. Foi analisada a apoptose celular das células que permaneceram aderidas (Ader) e daquelas que perderam a adesão (N-ad). Resultados expressos em porcentagem de células positivas para anexina V. Análise estatística por ANOVA seguido de teste de Tukey: $p>0,05$ em todas as comparações.

As células HUVEC apresentaram uma apoptose inicial mais acentuada no grupo controle, mas este resultado não foi estatisticamente significativo ($p>0,05$, Figura 6A), além de que a apoptose tardia não apresentou distinção entre os grupos ($p>0,05$, Figura 7A). Ainda, observa-se que as linhagens K562 (Figura 6B e 7B) e SC, exposta a fibronectina (Figura 6C e

7C) ou vitronectina (Figura 6D e 7D), apresentam resultados similares (p>0,05), não havendo distinção na apoptose gerada pela proteína, em células aderidas ou não aderidas, quando comparadas ao controle, independente da metodologia utilizada para observação da apoptose. Isso pode indicar que as células não sofrem apoptose importante em nosso modelo experimental.

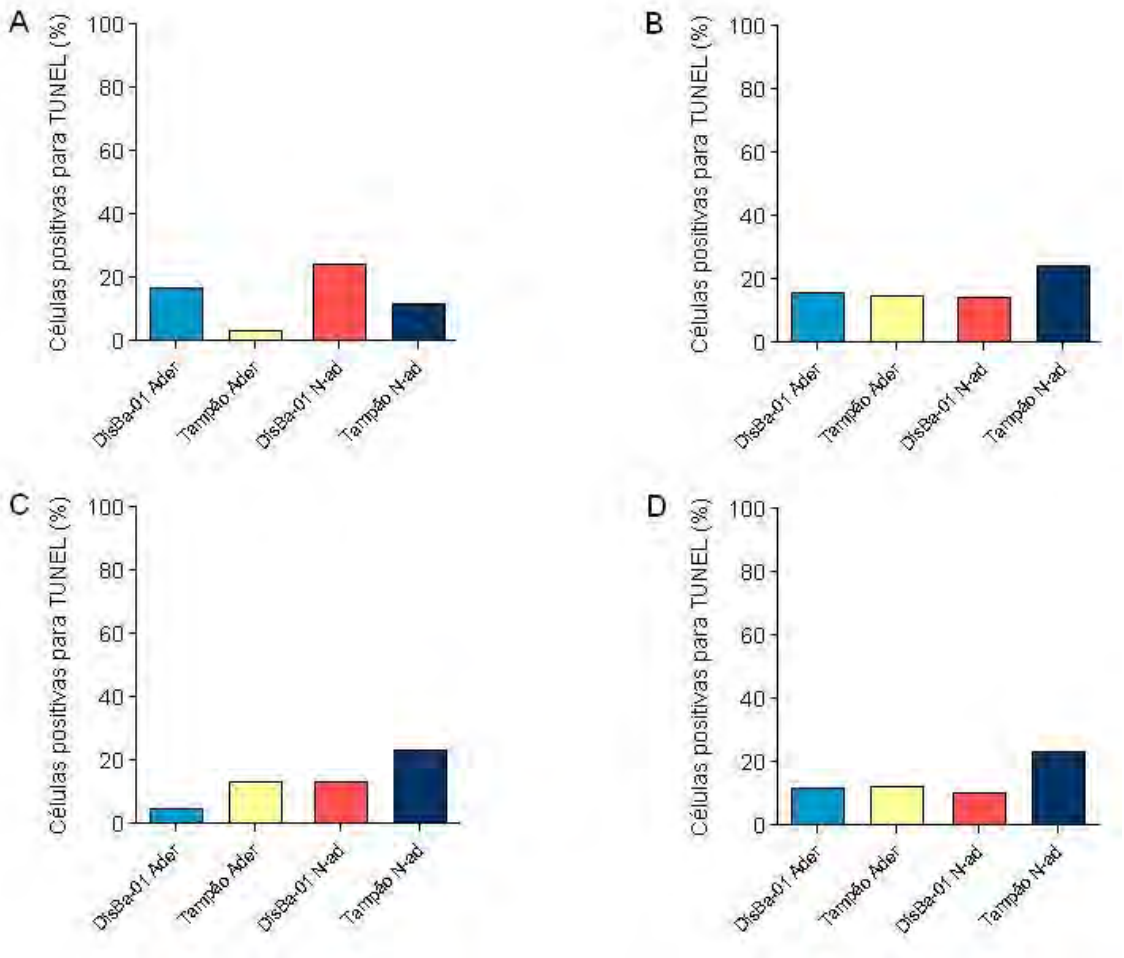


Figura 7. Apoptose tardia observada por TUNEL através do kit In Situ Cell Death Detection Kit (Roche) nas linhagens HUVEC (A), K562 (B) e SC (C e D), quando as células aderiram ou não à fibronectina (B e C) ou vitronectina (A e D). As células foram expostas à proteína Dis*Ba*-01 a 10 μM ou apenas tampão. Foi utilizado BSA como controle para a adesão celular. Foi analisada a apoptose celular das células que permaneceram aderidas (Ader) e daquelas que perderam a adesão (N-ad). Resultados expressos em porcentagem de células positivas para TUNEL. Análise estatística por ANOVA seguido de teste de Tukey: p>0,05 em todas as comparações.

Apesar da *anoikis* ser considerada uma forma de apoptose celular, (KROEMER et al., 2009), dados mais recentes indicam que outras formas de morte celular, além da *anoikis*, podem ocorrer quando uma célula perde adesão de seu substrato: necrose, principalmente por acúmulo de radicais livres gerados pelo estresse celular; autofagia induzida por perda de adesão; necroptose, que é o termo que descreve uma "necrose programada", com ativação de diversas vias de sinalização celulares específicas; e entose, com a absorção das células não aderidas por outras células (BUCHHEIT et al., 2012). Como foi observado pelos resultados de MTT que a proteína Dis*Ba*-01 pode gerar morte celular por atuação direta nas células, mas também parece gerar morte celular por perda de adesão (item 3.2.2.), parece agora que a morte gerada por perda de adesão não ocorre através de *anoikis*, visto que não houve um aumento na apoptose celular. De acordo, é conhecido que tumores sólidos bem sucedidos podem apresentar mecanismos intracelulares de resistência à *anoikis* (OKAYAMA, 2012), que são fundamentais para a formação de metástases (TADDEI et al., 2011), e por causa disso os mecanismos de resistência a *anoikis* tem sido mais estudados atualmente.

O câncer ganhou, nas últimas décadas, uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano de 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer (INCA, 2012). Diante de um problema de saúde mundial, esforços científicos vêm sendo feitos ao longo do último século no sentido de tentar combater esta doença.

A procura por compostos específicos que possuam atividades farmacológicas, atualmente, encontra-se em acentuada expansão. Devido a sua capacidade anti-metastática, anti-angiogênica e anti-trombótica, parcialmente mediada pela interação com a integrina αvβ3, a desintegrina Dis*Ba*-01 tem se mostrado um importante composto para o

desenvolvimento de novos fármacos (MCLANE et al., 2004; KAUSKOT et al., 2008; RAMOS et al., 2008; GONÇALVES, 2008; OLIVEIRA, 2009; PEDRETTI, 2009). Diante disso, nota-se a importância de mais estudos sobre os mecanismos de ação da Dis*Ba*-01, visando um maior entendimento do mesmo, para futuramente auxiliar no combate ao câncer.

4. CONCLUSÃO

Ao observarmos os resultados obtidos em nosso modelo, notamos que a presença da desintegrina Dis*Ba*-01 ocasiona uma diminuição significativa da viabilidade celular, particularmente notável para as populações celulares que perderam adesão. Entretanto, parece possível que tal morte celular não ocorra predominantemente por apoptose, no modelo experimental utilizado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOUDJIT, F.; VUORI, K. Integrin Signaling in Cancer Cell survival and Chemoresistance. *Chemother res. Pract*, 2012:283181, 2012.

AVRAAMIDES, C.J.; GARMY-SUSINI, B.; VARNER, J.A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer*, 8(8):604-617. doi:10.1038/nrc2353, 2008.

BUCHHEIT, C.L.; RAYAVARAPU, R.R.; SCHAFER, Z.T. The regulation of cancer cell death and metabolism by extracellular matrix attachment. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23402-411, 2012.

CROCI, D.O.; FLUCK, M.F.Z.; RICO, M.J.; MATAR, P.; RABINOVICH, G.A.; SCHAROVSKY, O.G. Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother*, 56:1687-1700, 2007.

DANEN, E.H.J. Integrin proteomes reveal a new guide for cell motility. *Science Signaling*, 2(89):58. doi:10.1126/scisignal.289pe58, 2009.

DAVIS, D.M. Mechanisms and functions for the duration of intercellular contacts made by lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*, 9:543-555, 2009.

DESGROSELLIER, J.S.; CHERESH, D.A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Reviews: Cancer*, 2010.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*, 45:969-985, 2005.

FRESHNEY, R.I. *Culture of Animal Cells:* A Manual of Basic Technique. Wiley-Liss, 672 p., 2005.

FRYER, H.J.; DAVIS, G.E.; MANTHORPE, M.; VARON, S. Lowry protein assay using an automatic microtiter plate spectrophotometer. *Analytical Biochemistry*, 153:262-266, 1986.

GENTILUCCI, L.; CARDILLO, G.; SPAMPINATO, S.; TOLOMELLI, A.; SQUASSABIA, F.; MARCO, R.; BEDINI, A.; BAIULA, M.; BELVISI, L.; CIVERA, M. Antiangiogenic Effect of Dual/Selective r5 β1/rvβ3 Integrin Antagonists Designed on Partially Modified Retro-Inverso Cyclotetrapeptide Mimetics. *J. Med. Chem.*, 53:106-118. doi:10.1021/jm9013532, 2010.

GONÇALVES, D.F.C. Minimização da estrutura da Dis*Ba*-01, uma desintegrina com potenciais atividades anti-trombótica e anti-metastática. Dissertação. Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2008.

GREGORY, C.D.; POUND, J.D. Cell death in the neighbourhood: direct microenvironmental effects of apoptosis in normal and neoplastic tissues. *J. Pathol.*, 223: 177–194, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100:57-70, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). *Estimativa 2012*: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: 2012. Versão online disponível em: <www.inca.gov.br>. Acesso em: 10/04/2012.

KAUSKOT, A.; COMINETTI, M.R.; RAMOS, O.H. Hemostatic effects of recombinant Dis*Ba*-01, a disintegrin from Bothrops alternatus. *Front Biosci*, 13:6604-6616, 2008.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.*, 26: 239–257, 1972.

KIM, Y.N.; KOO, K.H.; SUNG, J.Y.; YUN, U.J.; KIM, H. *Anoikis* Resistance: an Essential Prerequisite for Tumor Metastasis. *Int. J Cell Biol*., 2012: 306879, 2012.

KONSTANTOPOULOS, K.; THOMAS, S.N. Cancer Cells in Transit: The Vascular Interactions of Tumor Cells. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 11:177–202, 2009.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16: 3–11, 2009.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680-685. doi:10.1038/227680a0, 1970.

LIN, E.Y.; POLLARD, J.W. Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Res*, 67(11):5064-5066, 2007.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193:265-275, 1951.

MANTOVANI, A.; ROMERO, P.; PALUCKA, A.K.; MARINCOLA, F.M. Tumour immunity*:* effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet*, 371:771-783, 2008.

MCLANE, M.A.; SANCHEZ, E.E.; WONG, A.; PAQUETTE-STRAUB, C.; PEREZ, J.C. Disintegrins. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 4:327-355, 2004.

MERIC, J.B.; ROTTEY, S.; OLAUSSEN, K.; SORIA, J.C.; KHAYAT, D.; RIXE, O.; SPANO, J.P. Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. *Oncology Hematology*, 59:51–64, 2006.

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

OKAYAMA, H. Cell cycle control by anchorage signaling. *Cellular Signaling*, 241599-1609, 2012.

OLIVEIRA, C.R. Estudo dos efeitos biológicos de uma desintegrina recombinante do veneno da serpente *Bothrops alternatus*, Dis*Ba*-01, sobre a musculatura da parede abdominal após a indução de hérnia incisional em ratos. Dissertação. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, 2009.

PEDRETTI, A.C.E. Efeitos de uma desintegrina recombinante de *Bothrops alternatus*, DISBA-01, em células precursoras miogênicas (CPM). Dissertação. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, 2009.

RAMOS, O.H.; KAUSKOT, A.; COMINETTI, M.R.; BECHYNE, I.; PONTES, C.L.S.; CHAREYRE, F. A novel alpha(v)beta(3)-blocking disintegrin containing RGD motive, Dis*Ba*-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 19, 2008.

RAULET, D.H.; GUERRA, N. Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. *Nature Reviews*, 2009.

TADDEI, M.L.; GIANNONI, E.; FIASCHI, T.; CHIARUGI, P. *Anoikis*: an emerging hallmark in health and diseases. *The Journal of Pathology*, Accepted Article. doi: 10.1002/path.3000, 2011.

TEKLEMARIAM, T.; SEOANE, A.I.; RAMOS, C.J.; SANCHEZ, E.E.; LUCENA, S.E.; PEREZ, J.C.; MANDAL, S.A.; SOTO, J.G. Functional analysis of a recombinant PIII-SVMP, GST-acocostatin; an apoptotic inducer of HUVEC and HeLa, but not SK-MEL-28 cells. *Toxicon*, 57(5): 646–656, 2011.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G.J.; CLOOS, J. Cell Sensitivity Assays: the MTT Assay. *Methods Mol. Biol*., 731: 237-45, 2011.

WLODKOWIC, D.; TELFORD, W.; SKOMMER, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Apoptosis and Beyond: Cytometry in Studies of Programmed Cell Death. *Cell Biol. Methods*, 103: 55-98, 2011.

YAMAMOTO, A.; OCHIAI, M.; KAMACHI, K.; KATAOKA, M.; TOYOIZUMI, H.; ARAKAWA, Y.; HORIUCHI, Y. A clinically relevant in vitro pyrogen test using a human cell line that have the similar responsiveness to various pyrogens to that of human peripheral blood cells (hPBC). *AATEX*, 14:647-653, 2007.